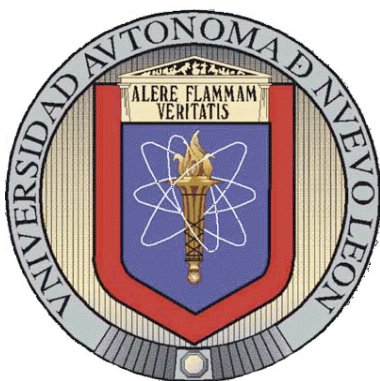


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**FACULTAD DE AGRONOMÍA
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE CALLO *in vitro* DE NOGAL (*Carya illinoensis* [Wangenh] K. Koch) A PARTIR DE DIFERENTES EXPLANTES

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

P R E S E N T A

KARELY YAZMÍN ESPINOSA GARCÍA

Escobedo, N.L.

Junio de 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**FACULTAD DE AGRONOMÍA
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE CALLO *in vitro* DE NOGAL (*Carya illinoensis* [Wangenh] K. Koch) A PARTIR DE DIFERENTES EXPLANTES

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

P R E S E N T A

KARELY YAZMÍN ESPINOSA GARCÍA

Escobedo, N.L.

Junio de 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**FACULTAD DE AGRONOMÍA
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE CALLO *in vitro* DE NOGAL (*Carya illinoensis* [Wangenh] K. Koch) A PARTIR DE DIFERENTES EXPLANTES

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA**

P R E S E N T A

KARELY YAZMÍN ESPINOSA GARCÍA

Escobedo, N.L.

Junio de 2014

**ESTA TESIS FUE REVISADA Y APROBADA POR EL COMITÉ PARTICULAR
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

COMITÉ PARTICULAR

Dr. José Elías Treviño Ramírez
Director

Dr. Emilio Olivares Sáenz
Co-Asesor

Dr. Rigoberto Vázquez Alvarado
Co-Asesor

Dr. Ernesto Javier Sánchez Alejo
**Subdirector de Posgrado
e Investigación**

DEDICATORIAS

A mis padres, Diamantina García de Espinosa y José León Espinosa González, por su incondicional apoyo, amor y entendimiento.

A mis hermanas, Ytzé y Cindy, por el apoyo moral que siempre me han brindado.

A mi sobrinito José Nicolás y María Victoria, por ser la alegría de la familia.

A mis amigos más cercanos que siempre me apoyaron.

AGRADECIMIENTOS

A las personas que de alguna u otra manera, intervinieron en la realización de mi investigación.

A la Facultad de Agronomía de Universidad Autónoma de Nuevo León por el apoyo proporcionado, tanto en las instalaciones, como en la beca.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por haberme otorgado la beca, la cual fue de vital importancia para la realización del programa.

A los siguientes Doctores integrantes de mi comité de tesis, el Dr. José Elías Treviño Ramírez, Dr. Rigoberto Vázquez Alvarado, Dr. Emilio Olivares Sáenz y al Dr. Héctor Lozoya por sus aportaciones técnicas y valiosas enseñanzas durante mi desarrollo profesional en la Maestría en Ciencias Agrícolas.

Al Dr. Juan Francisco Pissani Zúñiga por su amistad incondicional así como sus sugerencias y aportaciones a mi investigación.

A mis compañeros del laboratorio Nimbe Nayeli Carbajal e Iván Pequeño Granado por su gran apoyo, sus enseñanzas y los válidos consejos que me dieron.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Sección	Página
INDICE DE CUADROS.....	xv
INDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE.....	xx
INDICE DE FIGURAS.....	xxiii
INDICE DE FIGURAS DEL APÉNDICE.....	xxiv
RESUMEN.....	xxv
ABSTRACT.....	xxvii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Hipótesis	5
1.1.1 Hipótesis general	5
1.1.2 Hipótesis específica	5
1.2 Objetivo.....	6
1.2.1 Objetivo general	6
1.2.2 Objetivos específicos	6
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
2.1 Importancia Económica del Nogal	7
2.2 Propagación Clonal <i>in vitro</i>	7
2.3 Generalidades del Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales	9

2.4 Establecimiento de Cultivo <i>in vitro</i> de Tejidos Vegetales	11
2.4.1 Explante	12
2.4.2 Asepsia	14
2.4.3 Medios de cultivo	16
2.4.4 Condiciones ambientales para la incubación	20
2.4.5 Aclimatación de las plantas regeneradas <i>in vitro</i>	20
2.5 Cultivo de Callos	21
2.5.1 Crecimiento de callos y suspensiones celulares	22
2.6 Problemas de Oxidación en Explantes.....	23
2.6.1 Medidas para manejar el obscurecimiento de los explantes	25
cultivados <i>in vitro</i>	25
2.6.1.1 Reducción del posible daño durante el	
establecimiento	25
2.6.1.2 Remoción de sustancias fenólicas	25
2.6.1.3 Poda del tejido necrosado y uso de sellos en el	
explante	26
2.6.1.4 Estado físico y volumen del medio de cultivo	27
2.6.1.5 Uso de adsorbentes	27
2.6.1.5.1 Carbón activado (CA)	27
2.6.1.5.2 Polivinil pirrolidona (PVP) y polivinil	
polipirrolidona (PVPP)	28
2.6.1.6 Modificación de las condiciones ambientales	28
2.6.1.6.1 Plantas donadoras creciendo en	

oscuridad.....	28
2.6.1.6.2 Crecimiento de explantes en oscuridad o en baja irradiancia	29
2.6.1.6.3 Tratamientos con baja temperatura	29
2.6.1.7 Composición del medio de cultivo	29
2.6.1.7.1 Sales	29
2.6.1.7.2 Carbohidratos	29
2.6.1.7.3 Reguladores del crecimiento	30
2.6.1.7.4 Auxinas	30
2.6.1.7.5 Citoquininas	31
2.6.1.8 Modificación del potencial redox (E_h)	31
2.6.1.8.1 Antioxidantes	31
2.6.1.8.2 Antioxidantes en solución	32
2.6.1.8.3 Adición de antioxidantes al medio de cultivo	32
2.6.1.8.4 Otros antioxidantes	32
2.6.1.8.5 Compuestos que pueden acomplejar iones metálicos (Agentes quelatantes)	32
2.6.1.8.6 Reducción de la disponibilidad de oxígeno.	33
2.6.1.9 Fenoles, actividad fenolasa y disponibilidad de sustrato	33
2.6.1.10 Material donante	34
2.7 Cultivo <i>in vitro</i> en Nogal	35

3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
3.1 Localización del Experimento.....	38
3.2 Primer Experimento	39
3.2.1 Pretratamiento de las plantas en campo.....	39
3.2.2.Predesinfección de los explantes	39
3.2.3 Desinfección de los explantes	40
3.2.4 Siembra	41
3.2.5 Diseño experimental	42
3.3 Segundo Experimento	43
3.3.1 Pretratamiento de las plantas en campo.....	43
3.3.2.Predesinfección de los explantes	44
3.3.3 Desinfección de los explantes	44
3.3.4 Siembra	45
3.3.5 Diseño experimental	46
3.4 Tercer Experimento	47
3.4.1 Pretratamiento de las plantas en campo.....	48
3.4.2.Predesinfección de los explantes	48
3.4.3 Desinfección de los explantes	49
3.4.4 Siembra	49
3.4.5 Diseño experimental	50
3.5 Cuarto Experimento	51
3.5.1 Pretratamiento de las plantas en campo.....	52
3.5.2.Predesinfección de los explantes	52

3.5.3 Desinfección de los explantes	53
3.5.4 Siembra	54
3.5.5 Diseño experimental	54
3.6 Quinto Experimento	55
3.6.1. Predesinfección de los explantes	57
3.6.2 Desinfección de los explantes	57
3.6.3 Siembra	58
3.6.4 Diseño experimental	59
3.7 Sexto Experimento	60
3.7.1. Predesinfección de los explantes	60
3.7.2 Desinfección de los explantes	61
3.7.3 Siembra	61
3.7.4 Diseño experimental	62
3.8 Séptimo Experimento	63
3.8.1 Acondicionamiento previo <i>in vivo</i> de las plántulas	63
3.8.2. Predesinfección de los explantes	64
3.8.3 Desinfección de los explantes	64
3.8.4 Siembra	65
3.8.5 Diseño experimental	65
3.9 Octavo Experimento	66
3.9.1 Acondicionamiento previo <i>in vivo</i> de las plántulas	66
3.9.2. Predesinfección de los explantes	67
3.9.3 Desinfección de los explantes	67

3.9.4 Siembra	68
3.9.5 Diseño experimental	68
3.10 Noveno Experimento	69
3.10.1 Acondicionamiento previo <i>in vivo</i> de las plántulas	69
3.10.2. Predesinfección de los explantes	70
3.10.3 Desinfección de los explantes	70
3.10.4 Siembra	71
3.10.5 Diseño experimental	72
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	74
4.1 Primer Experimento	74
4.1.1 Porcentaje de oxidación	74
4.1.2 Porcentaje de contaminación bacteriana	76
4.1.3 Porcentaje de contaminación fúngica	76
4.2 Segundo Experimento	79
4.2.1 Porcentaje de oxidación	79
4.2.2 Porcentaje de contaminación bacteriana	80
4.2.3 Porcentaje de contaminación fúngica	81
4.3 Tercer Experimento	82
4.3.1 Porcentaje de oxidación	82
4.3.2 Porcentaje de contaminación bacteriana	85
4.3.3 Porcentaje de contaminación fúngica	86
4.4 Cuarto Experimento.....	87
4.4.1 Porcentaje de oxidación	87

4.4.2 Porcentaje de contaminación bacteriana	88
4.4.3 Porcentaje de contaminación fúngica	90
4.5 Quinto Experimento	93
4.5.1 Porcentaje de oxidación	93
4.5.2 Porcentaje de contaminación bacteriana	94
4.5.3 Porcentaje de contaminación fúngica	96
4.6 Sexto Experimento	97
4.6.1 Porcentaje de oxidación	97
4.6.2 Porcentaje de contaminación bacteriana	98
4.6.3 Porcentaje de contaminación fúngica	99
4.7 Séptimo Experimento	100
4.7.1 Porcentaje de oxidación	100
4.7.2 Porcentaje de contaminación bacteriana	101
4.7.3 Porcentaje de contaminación fúngica	101
4.2 Octavo Experimento	102
4.8.1 Porcentaje de oxidación	102
4.8.2 Porcentaje de contaminación bacteriana	103
4.8.3 Porcentaje de contaminación fúngica	103
4.9 Noveno Experimento	104
4.9.1 Porcentaje de oxidación	104
4.9.2 Porcentaje de contaminación bacteriana	105
4.9.3 Porcentaje de contaminación fúngica	105
4.9.4 Porcentaje de formación de callo	106

5. CONCLUSIONES	111
6. BIBLIOGRAFÍA.....	112
7. APENDICE	122

INDICE DE CUADROS

CUADRO	TÍTULO	PÁGINA
1	Alternativas metodológicas basadas en el cultivo de tejidos	11
2	Resumen de los efectos fisiológicos para los principales grupos de fitorreguladores.	17
3	Estrategias utilizadas en el cultivo <i>in vitro</i> , para evitar o disminuir los problemas oxidativos que ocurren en los explantes vegetales.	26
4	Concentración de reguladores de crecimiento para el medio WPM utilizado en el segundo establecimiento.	47
5	Tratamientos evaluados en el segundo experimento	47
6	Tratamientos evaluados en el tercer experimento	51
7	Productos y concentraciones utilizados para la predeinfección del cuarto experimento.	53
8	Tratamientos del cuarto experimento, donde se combinan tiempo de desinfección y sustancias utilizadas en la desinfección (alcohol e hipoclorito de sodio).	56
9	Tratamientos evaluados en el sexto experimento considerando procedencia de planta donadora, tipo de explante y tiempo de desinfección.	63
10	Comparación de medias de porcentaje de oxidación por semana en el primer experimento con los explantes de tipo hoja.	75
11	Comparación de medias para porcentaje de oxidación por tiempo de exposición y concentración de hipoclorito de sodio en el primer experimento con los explantes de tipo hoja.	76

12	Comparación de medias de porcentaje de contaminación bacteriana por efecto de permanencia en el antioxidante en el primer experimento con los explantes de tipo hoja	77
13	Comparación de medias de porcentaje de contaminación fúngica por semana en el primer experimento con los explantes de tipo hoja.	77
14	Comparación de medias de porcentaje de contaminación fúngica por nivel de hipoclorito de sodio en el primer experimento con los explantes de tipo hoja.	78
15	Comparación de medias de porcentaje de contaminación fúngica por tiempo de exposición al antioxidante en el primer experimento con los explantes de tipo hoja.	79
16	Comparación de medias de porcentaje de oxidación por semana en el segundo experimento con los explantes de tipo yema.	80
17	Comparación de medias de porcentaje de contaminación bacteriana por semana en el segundo experimento con los explantes de tipo yema.	82
18	Comparación de medias de porcentaje de contaminación fúngica dependiente del efecto por desinfección en el segundo experimento con los explantes de tipo yema	83
19	Comparación de medias del porcentaje de oxidación por semana en el tercer experimento con los explantes de tipo hoja y yema.	83
20	Comparación de medias de porcentaje de oxidación en explantes del tercer experimento.	84
21	Comparación de medias del porcentaje de oxidación por tiempo de inmersión en el antioxidante en el tercer experimento.	84
22	Comparación de medias del porcentaje de contaminación bacteriana por semana en el tercer experimento.	85
23	Comparación de medias del porcentaje de contaminación bacteriana por explante en el tercer experimento.	86

24	Comparación de medias del porcentaje de contaminación fúngica por semana en el tercer experimento.	86
25	Comparación de medias del porcentaje de contaminación fúngica por mayor tiempo de exposición al antioxidante en el tercer experimento.	87
26	Comparación de medias del porcentaje de oxidación por semana en el cuarto experimento.	88
27	Comparación de medias del porcentaje de oxidación por explante en el cuarto experimento.	88
28	Comparación de medias del porcentaje de contaminación bacteriana por explante en el cuarto experimento.	89
29	Comparación de medias del porcentaje de contaminación bacteriana dependiendo del pretratamiento en el cuarto experimento.	90
30	Comparación de medias del porcentaje de contaminación bacteriana dependiente del tiempo en pretratamiento en el cuarto experimento.	90
31	Comparación de medias del porcentaje de contaminación bacteriana dependiente de la desinfección con alcohol en el cuarto experimento.	91
32	Comparación de medias del porcentaje de contaminación fúngica dependiente del efecto: semana en el cuarto experimento.	91
33	Comparación de medias del porcentaje de contaminación fúngica dependiente del tipo de explante en el cuarto experimento.	92
34	Comparación de medias del porcentaje de contaminación fúngica dependiente de la desinfección con alcohol en el cuarto experimento	92
35	Comparación de medias del porcentaje de contaminación fúngica dependiente de la desinfección con hipoclorito de sodio en el cuarto experimento.	93
36	Comparación de medias del porcentaje de oxidación por semana en el quinto experimento.	93

37	Comparación de medias del porcentaje de oxidación dependiente del tipo de explante en el quinto experimento.	94
38	Comparación de medias del porcentaje de oxidación dependiente de la desinfección con cloro en el quinto experimento.	94
39	Comparación de medias del porcentaje de contaminación bacteriana para el efecto de semana en el quinto experimento.	95
40	Comparación de medias del porcentaje de contaminación bacteriana dependiente del tipo de explante en el quinto experimento.	95
41	Comparación de medias del porcentaje de contaminación bacteriana por efecto del medio de cultivo en el quinto experimento.	96
42	Comparación de medias del porcentaje de contaminación fúngica por semana en el quinto experimento.	96
43	Comparación de medias del porcentaje de contaminación fúngica por efecto del explante en el quinto experimento.	97
44	Comparación de medias del porcentaje de oxidación por semana en el sexto experimento.	98
45	Comparación de medias del porcentaje de oxidación para el efecto del explante en el sexto experimento.	98
46	Comparación de medias del porcentaje de contaminación bacteriana para el efecto semana en el sexto experimento.	99
47	Comparación de medias del porcentaje de contaminación fúngica para el efecto semana en el sexto experimento.	99
48	Comparación de medias del porcentaje de oxidación para el efecto de semana en el séptimo experimento.	101
49	Comparación de medias del porcentaje de oxidación por explante en el séptimo experimento.	101
50	Comparación de medias del porcentaje de oxidación para el efecto de semana en el octavo experimento	102

51	Comparación de medias del porcentaje de oxidación dependiente del efecto de desinfección con cloro en el octavo experimento.	103
52	Comparación de medias del porcentaje de contaminación fúngica por efecto de tipo de explante en el octavo experimento.	104
53	Comparación de medias del porcentaje de oxidación para el efecto de semana en el noveno experimento.	104
54	Comparación de medias del porcentaje de oxidación para el efecto de medio de cultivo en el noveno experimento.	105
55	Comparación de medias del porcentaje de contaminación fúngica para el efecto de semana en el noveno experimento.	106
56	Número de explantes con presencia de callo de nogal (<i>Carya illinoensis</i> [Wangenh] K. Koch) a las cuatro semanas del establecimiento, según el tipo de explante y medio de cultivo	107
57	Prueba DMS para la comparación de medias en la variable porcentajes de formación de callo para los efectos medios de cultivo y tipos de explante en el noveno experimento	109

INDICE DE CUADROS DEL APENDICE

CUADRO	TÍTULO	PÁGINA
1A	Componentes del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (1962)	127
2A	Componentes del medio de cultivo Woody Plant Medium (WPM) (1981).	128
3A	Experimento 1. Análisis de varianza para el porcentaje de oxidación en función de los efectos de semana, tratamientos con cloro y antioxidantes y sus interacciones en explantes de hoja	129
4A	Experimento 1. Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación con bacteria en función de los efectos de semana, tratamientos con cloro y antioxidantes y sus interacciones en explantes de hoja	129
5A	Experimento 1. Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación con hongos en función de los efectos de semana, tratamientos con cloro y antioxidantes y sus interacciones en explantes de hoja.	130
6A	Experimento 2. Análisis de varianza para el porcentaje de oxidación en función de los efectos de semana, tratamientos con cloro y antioxidantes y sus interacciones en explantes de yema.	130
7A	Experimento 2. Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación bacteriana en función de los efectos de semana, tratamientos con cloro y antioxidantes y sus interacciones en explantes de yema.	131
8A	Experimento 2. Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación fúngica en función de los efectos de semana, tratamientos con cloro y antioxidantes y sus interacciones en explantes de yema.	131

9A	Experimento 3. Análisis de varianza para el porcentaje de oxidación en función de los efectos de semana, tratamientos con cloro y antioxidantes y sus interacciones en explantes de hoja y yema.	133
10A	Experimento 3. Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación bacteriana en función de los efectos de semana, tratamientos con cloro y antioxidantes y sus interacciones en explantes de hoja y yema	133
11A	Experimento 3. Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación fúngica en función de los efectos de semana, tratamientos con cloro y antioxidantes y sus interacciones en explantes de hoja y yema.	134
12A	Experimento 4. Análisis de varianza para el porcentaje de oxidación en función de los efectos de semana, explante, pretratamientos, tiempo en pretratamiento, alcohol y cloro y sus interacciones.	135
13A	Experimento 4. Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación bacteriana en función de los efectos de semana, explante, pretratamiento, tiempo en pretratamiento, alcohol y tratamientos con cloro y sus interacciones.	139
14A	Experimento 4. Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación fúngica en función de los efectos de semana, explante, pretratamientos, tiempo en pretratamiento, alcohol y cloro y sus interacciones.	143
15A	Experimento 5. Análisis de varianza para el porcentaje de oxidación en función de los efectos de semana, explante, tratamientos con cloro y medio de cultivo y sus interacciones.	147
16A	Experimento 5. Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación bacteriana en función de los efectos de semana, explante, tratamientos con cloro y medio de cultivo y sus interacciones.	148
17A	Experimento 5. Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación fúngica en función de los efectos de semana, explante, tratamientos con cloro y medio de cultivo y sus interacciones.	149

18A	Experimento 6. Análisis de varianza para el porcentaje de oxidación en función de los efectos de semana, explante y tratamientos con cloro y sus interacciones.	150
19A	Experimento 6. Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación bacteriana en función de los efectos de semana, explante y tratamientos con cloro y sus interacciones.	150
20A	Experimento 6. Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación fúngica en función de los efectos de semana, explante y tratamientos con cloro y sus interacciones.	151
21A	Experimento 7. Análisis de varianza para el porcentaje de oxidación en función de los efectos de semana, explante y tratamientos con cloro y sus interacciones.	151
22A	Experimento 7. Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación bacteriana en función de los efectos de semana, explante y tratamientos con cloro y sus interacciones.	152
23A	Experimento 7. Análisis de varianza para la contaminación fúngica en función de los efectos de semana, explante y tratamientos con cloro y sus interacciones.	152
24A	Experimento 8. Análisis de varianza para el porcentaje de oxidación en función de los efectos de semana, explante y tratamientos con cloro y sus interacciones..	153
25A	Experimento 8. Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación fúngica en función de los efectos de semana, explante y tratamientos con cloro y sus interacciones.	153
26A	Experimento 9. Análisis de varianza para el porcentaje de oxidación en función de los efectos de semana, explante y medio de cultivo y sus interacciones.	154
27A	Experimento 9. Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación fúngica en función de los efectos de semana, explante y medio de cultivo y sus interacciones.	154
28 A	Experimento 9. Análisis de varianza para la formación de callo	155

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	Plantas donadoras de material vegetal a) plántulas provenientes de semillas criollas germinadas en cajas magenta, b) plántulas de 3 meses de edad provenientes de semillas criollas sembradas en bolsas establecidas en el laboratorio, c) plántulas de 1 mes en campo d) árboles criollos juveniles de 2 años.	38
2	Explantos tipo hoja y nervadura a) corte de nervadura y b) corte de láminas de hoja.	41
3	Extracción de yema para explante. a) segmento de vareta con 2 yemas b) corte superior para extraer yema c) corte lateral y desprendimiento de la yema. d) extracción de yema.	42
4	Obtención de explantes de raíz a partir de plántulas de nogal criollo; a) raíz de plántula germinada en caja magenta, b) plántula de nogal criollo de 1 mes de edad extraída de campo abierto c) acercamiento hacia la raíz de la fotografía b, raíz segmentada.	58
5	Obtención de explantes de tallo; a) plántula de nogal criollo, b) cortes del tallo.	71
6	Pasos generales del establecimiento a) pretratamiento <i>in vivo</i> , b) selección del material vegetal, c) material vegetal seleccionado, d) material para el primer lavado con agua corriente y jabón, e) predesinfección con fungicidas y bactericidas en agitación, f) colocación de explantes con solución desinfectante al vacío, g) desinfección en campana, h) tratamiento con antioxidante, i) corte del explante, j) siembra del explante en medio de cultivo, k) incubación en oscuridad, l) observación de las unidades experimentales.	73
7	Explantos de nogal con presencia de callo en la cuarta semana del establecimiento a) explante tipo hoja; b) explante tipo tallo y c) explante tipo nervadura central	107

INDICE DE FIGURAS DEL APENDICE

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1A	Metodología a seguirse para el cultivo <i>in vitro</i> de hojas y yemas a partir de árboles juveniles de nogal (<i>Carya illinoensis</i> [Wangenh] K. Koch).	123
2A	Metodología a seguirse para el cultivo <i>in vitro</i> de raíz, tallo y nervadura central a partir de plántulas de 1 mes de nogal (<i>Carya illinoensis</i> [Wangenh] K. Koch).	124
3A	Metodología a seguirse para el cultivo <i>in vitro</i> de tallo de nogal (<i>Carya illinoensis</i> [Wangenh] K. Koch). a partir de plántulas recién emergidas en cajas magenta.	125
4A	Metodología a seguirse para el cultivo <i>in vitro</i> de hoja, tallo y nervadura central de nogal (<i>Carya illinoensis</i> [Wangenh] K. Koch).a partir de plántulas recién emergidas en bolsas plásticas conservadas en condiciones controladas.	126

RESUMEN

La producción mundial de nuez con cáscara se estima actualmente en 216 mil t año⁻¹; las exportaciones mexicanas a países asiáticos en 2011 superaron los 13 millones de dólares, un 70 % más que el año anterior. Nuevo León se destaca como el principal estado proveedor de plantas, principalmente para Sonora, Chihuahua, Coahuila, Baja California, Durango, Sinaloa, Hidalgo, San Luis Potosí, entre otros.

La alta demanda de plantas de muy buena calidad, libre de enfermedades y procedentes de árboles con características de producción de nuez ampliamente aceptada en el mercado requiere de modernas metodologías de producción de plantas como el cultivo de tejidos vegetales. Por tal motivo el objetivo de esta investigación fue formar callo de nogal criollo *in vitro* a partir de diferentes explantes. La investigación consistió de nueve experimentos en donde los primeros ocho estuvieron dedicados al desarrollo de una metodología para tener explantes precursores de callo libres de contaminantes y sin oxidación del tejido vegetal. El noveno experimento se realizó para identificar el mejor medio y tipo de explante para la formación de callo. Los medios estudiados fueron MS y WPM y los explantes fueron hojas, nervaduras y tallos.

La metodología obtenida en los primeros ocho experimentos para obtener explantes libres de contaminación y sin oxidación fue la siguiente: tener material vegetal en condiciones controladas a las cuales se les dio tratamiento *in vivo* para ayudar a erradicar los problemas por contaminantes. Para la obtención de los explantes se emplearon plántulas de 90 días; éstas fueron lavadas y sometidas durante 2 h a una solución antifúngica. La desinfección se realizó con alcohol al 20% (v/v) por 10 min e hipoclorito de sodio al 1.08% (20% v/v Cloralex®) por 10 min.

En el noveno experimento, en donde se logró la formación de callo, se observó que la oxidación no fue mayor del 17%; se logró erradicar la contaminación por bacterias; la contaminación por hongos se presentó pero en porcentajes muy bajos (8%). En la cuarta semana los explantes presentaron callo. La mejor proliferación de callo se obtuvo con el medio MS con los explantes de hoja y nervadura.

ABSTRACT

Pecan world wide production was about 216 000 ton in 2011; Mexico exported 13 mmd which was 70 % higher than previous year. Nuevo Leon is the best positioned state in the country as a high quality plant provider mainly to Sonora, Chihuahua, Coahuila, Baja California, Durango, Sinaloa, Hidalgo and San Luis Potosí.

Pecan production requires plants of good quality, free of diseases and from trees with walnut characteristics widely accepted in the market. Extensive plant production with these characteristics requires modern techniques such as plant tissue culture. Therefore the objective of this research was to generate a protocol to obtain callus for further use *in vitro* pecan plant production. The research consisted of nine experiments in which the first eight were dedicated to the development of a methodology to obtain explants free of contaminants to be able to form callus without oxidation of the plant tissue. The ninth experiment was performed to identify the best medium and type of explants for callus formation. The media were MS and WPM and explants were leaves, stems and ribs.

The methodology obtained in the first eight experiments to obtain uncontaminated explants without oxidation was: walnut plants were grown under aseptic conditions using fungicides and bactericides and after 90 days explants were collected. Explants were washed for 2 h under an antifungal solution and disinfection was performed with 20% alcohol (v / v) for 10 min and sodium hypochlorite 1.08% (20% v / v Cloralex ®) for 10 min.

In the ninth experiment, in which the formation of callus was obtained, it was observed that the oxidation was not more than 17%; bacterial contamination was eradicated; fungal contamination was presented but in very low percentages (8%). In the fourth week the explants showed callus. The better callus proliferation was obtained with MS medium with leaf and midrib explants.

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de nuez pecanera en México es una actividad en amplio crecimiento, sobre todo en estados del norte, debido a la amplia adaptación climática y edafológica, así como por las condiciones de mercado y atractiva rentabilidad que presenta, al canalizarse a Estados Unidos de América (Orona *et al.* 2013) .

Con una producción aproximada de 600,000 plantas por año, Nuevo León se ha convertido en el principal proveedor de plantas de nogal para el establecimiento de nuevas huertas, principalmente para los estados de Sonora, Chihuahua y Coahuila, aunque en menor proporción, se suman a la lista los estados de Baja California, Durango, Sinaloa, Tamaulipas, Hidalgo y San Luis Potosí (*). Cabe mencionar que existe cierta demanda por parte de otros países para obtener dicho material vegetal, como es el caso de EUA, España, China y Argentina.

La propagación del nogal pecanero se realiza principalmente por injerto de variedades mejoradas en portainjertos de semillas. La propagación por esqueje conduce a patrones clonales uniformes, sin embargo es muy difícil de conseguir ya que estos no enraizan fácilmente, incluso con el uso de hormonas vegetales (Renukdas *et al.*, 2010).

(*) Comunicación personal con M. C. David Cortés Investigador del INIFAP en Montemorelos N.L.
octubre del 2012

La propagación *in vitro*, es una tecnología bien conocida y manejada con experiencia en muchos países del mundo. En la actualidad, se conoce que ha sido aplicada con diversos objetivos, tales como producción masiva de plantas, mejoramiento y obtención de plantas libres de patógenos; además, representa una vía directa para mantener características genéticas de un árbol *elite*. Esto abre nuevas perspectivas para la producción de grandes volúmenes de plantas a corto y mediano plazo, bajo control y ocupando menos espacio; ofreciendo un gran potencial de apoyo a los métodos tradicionales (Altman y Loberant, 1998). Así mismo se puede contribuir al desarrollo de una nueva agricultura sustentada en el uso reducido de fertilizantes químicos, en el biocontrol de plagas y en el cultivo de plantas que expresan características de tolerancia o resistencia, ya sea a factores de estrés biótico (microorganismos e insectos), o factores abióticos (altas o bajas temperaturas, altas concentraciones salinas y suelos áridos). El cultivo *in vitro* en especies leñosas, permite la regeneración de plantas completas; dicho método, comenzó hace más de cincuenta años en especies forestales, pero hasta la fecha los resultados son limitados a pesar del gran número de especies estudiadas (Acosta, 2012).

A pesar de los progresos realizados hasta el momento, los estudios de cultivo de tejidos que involucran plantas leñosas han sido siempre muy difícil. Entre varias razones, la falta de una fuente de explante adecuado sigue siendo un obstáculo importante para limitar el éxito (Aftab, 2012).

Con respecto a nogal, se han encontrado reportes principalmente encaminados a la obtención de tejido embriogénico. Wood (1982) y Knox y Smith (1981) intentaron establecer la proliferación de cultivos de brotes a partir de segmentos nodales de plántulas; a pesar de que se obtuvo elongación, el sistema radicular era escaso y no se pudieron establecer las plantas en sustrato. Corte-Olivares y Philips (1990) obtuvieron elongación de los brotes utilizando yemas apicales y axilares de árboles adultos pero el enraizamiento y establecimiento de las plántulas fue insatisfactorio. Obeidy y Smith (1993) abordaron el problema relacionado con la contaminación fúngica mediante la manipulación de la disponibilidad de agua del medio. La micropropagación se ve limitada debido al bajo índice de enraizamiento, altas tasas de contaminación y poca regeneración. Con ayuda también de cultivo *in vitro* y empleando explantes nodales, Renukdas *et al.* (2010), lograron desarrollar una metodología para la propagación del nogal *in vitro* hasta lograr su enraizamiento y transferencia a sustrato para su posterior establecimiento y aclimatación en invernadero. Ávila-Treviño *et al.*, (2013) lograron reducir el necrosamiento en esta especie empleando diferentes combinaciones de carbón activado al 1%, polivinilpirrolidona (PVP) al 0.1%, nitrato de plata (AgNO₃) al 1%, ácido ascórbico y ácido cítrico en cantidades de 100 y 150 mg L⁻¹ respectivamente; además indujeron callos embriogénicos a partir de hojas utilizando 2,4-D, sin embargo la mayor producción de callos se obtuvieron con tiazurón (TDZ), y para el caso de los explantes de yemas axilares la combinación kinetina (KIN), benciladenina (BA) y ácido indolbutírico (AIB) incrementó el número de hojas y plántulas, y longitud de brotes.

La principal limitante para la propagación masiva *in vitro* del nogal pecanero es la contaminación por hongos, la cual ha sido reportada anteriormente (Renukdas *et al.*, 2010; Beuchat 1975; Chipley and Heaton 1971; Hanlin 1971; Schroeder and Cole 1977).

Barrales (2013) indica que la oxidación es uno de los problemas más comunes en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales producido por la emisión de sustancias fenólicas al medio de cultivo, la cual provoca afectaciones en el desarrollo del explante.

Por lo anterior, en el presente trabajo se pretende obtener agregados celulares de nogal por medio del uso del cultivo de tejidos vegetales empleando diferentes técnicas, medios de cultivo y tipos de explante.

1.1 Hipótesis

1.1.1 Hipótesis general

1.- Los explantes de nogal (*Carya illinoensis* [Wangenh] K. Koch) presentan capacidad de regeneración celular, por lo tanto se pretende obtener callo *in vitro*.

1.1.1 Hipótesis específicas

- 1.- Los explantes de nogal se pueden establecer bajo condiciones asépticas.
- 2.- Los explantes de nogal se pueden establecer *in vitro* sin problemas de oxidación en sus tejidos.
- 3.- Para tener éxito en la formación de callo *in vitro* en nogal es importante seleccionar el medio de cultivo y el explante adecuado.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Obtener formación de callo *in vitro* de nogal (*Carya illinoensis* [Wangenh] K. Koch) a partir de diferentes tipos de explante.

1.2.2 Objetivos específicos

- 1.- Establecimiento aséptico de los explantes
- 2.- Establecimiento de los explantes libres de oxidación
- 3.- Estudiar cual es el medio de cultivo y explante para el establecimiento del nogal pecanero.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Importancia Económica del Nogal

La producción de nogal pecanero es una de las actividades agrícolas principales en el norte de México, especialmente en Chihuahua, Coahuila, Sonora, Durango y Nuevo León en ese orden, ya que se ha constituido en una especie con buena relación beneficio-costos, ya que el ingreso bruto promedio oscila entre 37 y 106 mil pesos ha^{-1} y la producción promedio anda alrededor de 1.23 ton ha^{-1} (SNIDRUS-OEIDRUS, 2013).

2.2 Propagación Clonal *in vitro*

De acuerdo con Kester (1982), un clon es la regeneración de un solo genotipo, representado por una planta, un ápice, un meristemo o cualquier fragmento vegetal.

Es importante que las especies hortícolas o forestales tengan un tipo uniforme para asegurar altos rendimientos. Esto se consigue solo si los propágulos son genéticamente idénticos. El cultivo *in vitro* se ha empleado con éxito para satisfacer esta necesidad.

Las ventajas de este método son varias:

- a) Se pueden multiplicar grandes cantidades de plantas en un espacio pequeño (George y Sherrington, 1984; Villalobos y Thorpe, 1985)
- b) La propagación se hace en condiciones asépticas. Las plántulas obtenidas están libres de hongos y bacterias (George y Sherrington, 1984; Locy, 1984).
- c) Se puede generar un mayor número de plantas en un tiempo dado, hecho importante en el fitomejoramiento, por que se reduce el período entre la obtención y la difusión de un nuevo cultivar (Locy, 1984; Villalobos y Thorpe, 1985).
- d) El proceso puede hacerse durante todo el año, independientemente de cambios estacionales (George y Sherrington, 1984; Locy, 1984).
- e) Los cultivos solo requieren de cuidados durante las transferencias (George y Sherrington, 1984).

Lógicamente, también existen algunas desventajas que puedan limitar su uso:

- a) Se necesita de personas hábiles para que las operaciones tengan éxito (George y Sherrington, 1984; Locy, 1984).
- b) El procedimiento puede ser costoso, especialmente si se compara con la propagación por estacas (Locy, 1984).
- c) A pesar de que la multiplicación es rápida, e establecimiento aséptico puede requerir de un largo tiempo (Locy, 1984).
- d) Las plantas obtenidas en corto tiempo son muy pequeñas y es necesario un período de aclimatación para poder trasplantarlas al campo (George y Sherrington, 1984)

- e) Por su estrecha base genética, las poblaciones clonales son susceptibles a cambios climáticos, a plagas y enfermedades. Esto provoca su degeneración con el paso del tiempo (Gupta *et al.*, 1981; Kester, 1982).
- f) Se corre el riesgo de que aparezcan variaciones y que éstas se multipliquen, sin que se note que no son iguales al genotipo seleccionado (Kester, 1982). Este fenómeno recibe el nombre de variación somaclonal (Hughes, 1981). Estas variaciones pueden originarse por mutaciones genéticas espontáneas, por formación de quimeras, por cambios epigenéticos (variación en la expresión fenotípica que se perpetúa durante la propagación pero que no involucra cambios permanentes en el genotipo) o por infección sistémica de patógenos, por ejemplo virus (Kester, 1982).
- g) Pérdida de la capacidad morfogénica de los explantes, luego de muchos subcultivos (Hughes, 1981).

2.3 Generalidades del Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales

El cultivo de tejidos supone la manipulación de tallos, raíces, embriones, callos, células, protoplastos, etc. que se cultivan asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuban en condiciones ambientales controladas. Tan variada fuente de inóculos permite ampliar considerablemente las posibilidades que otras técnicas ofrecen; sobre todo, cuando el cultivo de tejidos se interpreta como un modelo axénico que permite estudiar y dirigir ciertos procesos basados en la totipotencia celular (Rodríguez *et al.*, 2005).

Generalmente es común dividir las técnicas del cultivo de tejidos en dos grandes grupos: a) cultivos en medios semisólidos y b) cultivos en medios líquidos. Los cinco tipos de cultivos de tejidos vegetales más importantes son: cultivo de la planta completa, cultivo de embriones, cultivo de órganos, cultivo de callos y cultivo de células en suspensión (células aisladas o pequeños agregados). Para el establecimiento de los cultivos utilizando cualquiera de los sistemas es necesario tener en cuenta algunos aspectos generales comunes relacionados con el explante, la asepsia, el medio de cultivo y las condiciones ambientales de la incubación (Echenique *et al.*, 2004).

Aunque en especies forestales existen puntos todavía sin resolver, se pueden enumerar las siguientes ventajas (Rodríguez *et al.*, 2005):

- Clonación rápida de híbridos o árboles elite para producción comercial.
- Multiplicación de portainjertos y variedades autoenraizables.
- Obtención de plantas libres de virus
- Alternativas a problemas de crecimiento lento
- Obtención de plantas haploides
- Rescate de embriones, con incompatibilidad endospermica (angiospermas) o gaméticas (gimnospermas)
- Intercambio de germoplasma
- Almacenamiento
- Determinación de clones para: colonización, adaptación, tolerancia
- Estadios de incompatibilidad, etc.

La biología celular (Cuadro 1), constituye un área donde se incluyen regeneración, micropropagación y técnicas de transformación (Rodríguez *et al.*, 2005):

Cuadro 1. Alternativas metodológicas basadas en el cultivo de tejidos

<p>MICROPROPAGACIÓN: Obtención de individuos genéticamente iguales</p> <p>corto y mediano plazo</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Proliferación de múltiples tallos mediante liberación de yemas axilares inhibidas. • Activación de meristemos preformados ¿genéticamente estables?. • Explotación de la ganancia genética resultado de programas de mejora en un tiempo más corto: gran número de individuos. Reforestación Clonal. • Obtención de plantas genéticamente superiores. • Flexibilización de operaciones comerciales.
<p>ORGANOGENESIS</p> <p>REGENERACIÓN</p> <p>EMBRIOGÉNESIS: Obtención de individuos no clonales</p> <p>Mediano y largo plazo</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Cultivo de callo, suspensiones celulares, aislamiento y proliferación celular, protoplastos, anteras, polen. • Mejora no dirigida. • Mejora, selección rápida de caracteres deseables. • Selección de resistencias, estrés químico, biótico y abiótico. • Caracteres mono, oligénicos y poligénicos. • Posibilidad de análisis genético: gametoclinal. • Semillas sintéticas: embriogénesis.
<p>TRANSFORMACIÓN: Incorporación estable de caracteres genéticos</p> <p>Largo plazo</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Mejora dirigida medida por Agrobacterium. • Incorporación DNA en protoplastos. • Bombardeo, microinyección. • Resistencias dirigidas: calidad de madera, resistencias. • Regulación del desarrollo.

2.4 Establecimiento del Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales

Para el establecimiento de los cultivos es necesario tener en cuenta algunos

aspectos generales comunes relacionados con el explante, la asepsia, el medio de cultivo y las condiciones ambientales de incubación.

2.4.1 Explante

Varios factores deben ser tenidos en cuenta en la elección del explante apropiado para el establecimiento de los cultivos *in vitro*, entre ellos (Mroginski *et al.* 2010):

a) Objetivo del cultivo: si bien es difícil tratar de clasificar las aplicaciones que se persiguen con el cultivo de tejidos, se podría esquematizarlas en aplicaciones para:

- Estudios básicos.
- Obtención de plantas con sanidad controlada.
- Micropropagación.
- Obtención de híbridos interespecíficos.
- Obtención de plantas de semillas con embriones rudimentarios.
- Obtención de plantas
- Inducción de variación somaclonal.
- Producción y/o conversión de sustancias útiles.
- Obtención de híbridos somáticos.
- Conservación e intercambio de germoplasma.
- Establecimiento de suspensiones celulares.

b) Posibilidad de contaminación con microorganismos. De ser posible, se deben cultivar explantes de plantas donantes que crecen en condiciones de invernadero, con ello se reduce sustancialmente las tasas de contaminación. Por otra parte, es

recomendable evitar el uso de explantes sucios (raíces, rizomas) que provienen de plantas crecidas en macetas o en el campo, dado que en la mayoría de los casos no es posible conseguir una buena desinfección de los mismos.

c) Edad fisiológica. Este es un aspecto de gran influencia en la morfogénesis. Como regla general se puede decir que cuando más joven e indiferenciado se encuentre el explante a cultivar, mejor será su respuesta *in vitro*. Es por ello que los meristemas apicales y axilares son ampliamente usados en numerosas especies. En el caso de la micropropagación de plantas leñosas, la edad del explante es un factor crítico. Si los tejidos son jóvenes, la micropropagación tiene mayores posibilidades de ser exitosa que con tejidos maduros.

d) Tamaño. En general, cuanto más grande sea el explante mayores serán las posibilidades de inducir la proliferación de callos o la regeneración directa de órganos. Sin embargo, a mayor tamaño de explante también son mayores las probabilidades de que los cultivos se contaminen con microorganismos.

e) Época del año. Es un factor que suele tener mucha importancia en la micropropagación y que generalmente está asociado al grado de dormición que presentan ciertos explantes (yemas, por ejemplo) y también con la posibilidad de mayor o menor proliferación de microorganismos.

2.4.2 Asepsia

Uno de los principales problemas que se presentan cuando se tratan de establecer los cultivos *in vitro* es el de la contaminación de los mismos con diversos tipos de microorganismos (hongos, levaduras, bacterias, fitoplasmas, virus). El ambiente generado por explante-medio de cultivo-condiciones físicas de incubación es altamente propicio para la proliferación de muchos de estos microorganismos que pueden provocar la destrucción de los cultivos. Es muy difícil conseguir cultivos estrictamente asépticos dado que en la mayoría de los casos es altamente probable que los mismos contengan virus y fitoplasmas, por lo que en la práctica, cuando se refiere a cultivos asépticos, en general se quiere significar que son cultivos donde no se produce la proliferación de hongos y bacterias (Mroginski y Roca 1991).

Para evitar y/o minimizar las contaminaciones de los cultivos con microorganismos es necesario (Mroginski *et al.* 2010) :

- 1) Conocer el material vegetal con que se trabaja y los posibles contaminantes específicos.
- 2) Realizar una adecuada preparación de la planta dadora de explantes, cultivándola preferentemente en invernaderos tratados con productos químicos que eliminen patógenos y eventuales microorganismos endófitos.
- 3) Proceder a la desinfección superficial de los explantes mediante el uso de compuestos químicos con el objeto de eliminar los microorganismos con el menor daño posible para el explante. Si bien no es posible recomendar un procedimiento general, se puede señalar que el procedimiento más

popularizado consiste en una doble desinfección mediante la inmersión de los explantes en etanol (70%v/v) durante 20-60 segundos seguido de hipoclorito de sodio 1 - 3%, contenido en el agua de lavandina comercial, durante 3 a 30 minutos, dependiendo de la naturaleza del explante. Algunos procedimientos se basan en el empleo de únicamente etanol o de hipoclorito de sodio. Finalmente, es necesario eliminar los restos de estos productos mediante varios lavados con agua destilada estéril. El lavado previo de los explantes con agua corriente y detergentes, ayuda a una mejor desinfección. La inmersión de los explantes en soluciones conteniendo sustancias antibióticas y /o antimicóticas puede ser de utilidad. En los casos en que se utilicen plántulas crecidas *in vitro* como plantas donantes de explantes, es necesario desinfectar las semillas para su cultivo y germinación y luego es aconsejable desinfectar también las plántulas resultantes.

4) Emplear medios e instrumentos de cultivo esterilizados, es decir, liberados completamente de cualquier microorganismo vivo o esporas. Para la esterilización, en la mayoría de los casos se hace uso del calor en sus diversas formas: llama directa, calor húmedo (en forma de vapor abierto o bajo presión), calor seco (aire caliente).

5) Cultivar los explantes en una cámara de transferencia con aire estéril localizada en un ambiente limpio y no expuesta a corrientes de aire.

6) Incubar los cultivos en cámaras o cuartos de cultivo, cerrados, libres de corrientes de aire y bien higienizados. En lo posible se debe restringir la circulación de personas, y los recipientes con cultivos contaminados deben ser rápidamente eliminados de este sector.

2.4.3 Medios de cultivo

Un medio de cultivo puede ser definido como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos. Existen numerosas formulaciones, cada una de las cuales comprende entre 6 y 40 compuestos. Básicamente, los medios de cultivo se componen de compuestos que suministran (Mroginski *et al.* 2010):

- *Fuente de carbono:* La sacarosa, en concentraciones de 2 al 5%, es el azúcar más utilizado. En algunos medios se le reemplaza por glucosa. En casos particulares se cita el empleo de maltosa o galactosa. También myo-inositol (100 mg/L) suele ser incorporado a los medios resultando un mejor crecimiento de los cultivos.
- *Nutrientes minerales:* Los medios de cultivo deben suministrar los mismos macro y micronutrientes que son esenciales para el crecimiento de las plantas enteras.
- *Sustancias vitamínicas:* De todas las que comúnmente se incorporan a los medios, pareciera que la tiamina es la única realmente imprescindible para el buen crecimiento de los cultivos.
- *Sustancias reguladoras del crecimiento:* En la mayoría de los casos los medios utilizados para el establecimiento de los cultivos contienen auxinas (ANA, 2,4-D, AIA, AIB, NOA, Dicamba, Picloram) y/o citocininas (BA, KIN, ZEA, 2iP, Thidiazurón). Las giberelinas (especialmente GA3) son requeridas en algunas ocasiones para el cultivo de meristemas o para la elongación de brotes. El ABA, es usado en algunos casos.

En el Cuadro 2 se resumen los efectos fisiológicos observados, para cada uno de

los principales grupos de fitorreguladores cuando se aplican en el cultivo *in vitro* de tejidos (Rodríguez *et al.*, 2005b)

Las auxinas más empleadas son el ácido indolacético (AIA), que es foto y termosensible, el ácido naftalenacético (ANA), análogo al anterior y resistente a la oxidación, el ácido indolbutírico (IBA), que es sustituyente eficientemente al AIA en los cultivos asépticos y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) que es efectivo en inducir callos, pero también mutaciones (Zaerr y Mapes, 1982).

Cuadro 2. Resumen de los efectos fisiológicos para los principales grupos de fitorreguladores.

Fitorregulador	Efectos
Auxinas	Inducen elongación de la pared celular. Inducen división celular (junto con citoquininas). Participan en la organización de meristemos. Promueven diferenciación vascular.
Citoquininas	Estimulan división celular (junto con auxinas). Rompen dormición en yemas laterales. Inducen formación de yemas adventicias.
Giberelinas	Disminuyen o impiden la formación de raíces, tallos o embriones somáticos. Se necesitan en el posterior desarrollo de órganos preformados.
Ácido abscísico	A bajas concentraciones afecta positivamente los cultivos y a altas concentraciones los inhibe. Es esencial para la maduración y crecimiento normal de embriones somáticos. Aumenta la tolerancia a la congelación.

Continúa: Cuadro 2

Etileno	<p>Dependiendo del momento del subcultivo puede estimular o inhibir organogénesis.</p> <p>Promueve maduración de frutos.</p> <p>Promueve senescencia y abscisión de hojas.</p> <p>Afecta la elongación de tallos y raíces.</p> <p>Afecta la formación de yemas axilares y adventicias.</p> <p>Afecta enraizamiento.</p> <p>Afecta la embriogénesis.</p>
Poliaminas	<p>Aumenta la morfogénesis en muchos cultivos (putrescina, espermidina y espermina)</p> <p>Incrementan división celular.</p> <p>Participan en la formación de embrioides.</p>
Jasmonatos	<p>Retardan la formación de callos.</p> <p>Inhiben rizogénesis.</p> <p>Promueven formación de yemas en cultivos de meristemas de patata.</p> <p>Estimulan la formación de bulbos.</p>
Ácido salicílico y derivados	<p>Inducen tuberización.</p>
Oligosacarinas	<p>Promueven la proliferación de callos (en presencia de auxinas).</p> <p>Aumentan el número de raíces adventicias en cultivos de embriones de avena (en ausencia de auxinas).</p> <p>Controlan la organogénesis en cultivos de tabaco.</p> <p>Inhiben el enraizamiento estimulado por auxinas en explantes de hoja de tabaco.</p> <p>Inhiben la embriogénesis dependiente de auxina en cultivos de zanahoria.</p> <p>Restablecen la capacidad embriogénica en mutantes no embriogénicos de células de zanahoria.</p>

Algunas citocininas que se emplean corrientemente son la furfurilaminopurina o cinetina (K), la bencilaminopurina (BAP), más efectiva y estable que la anterior, la 2-isopenteniladenina (2-iP), y la zeatina. Estas dos últimas se han utilizado poco, a veces con resultados erráticos, en el cultivo de tejidos de plantas leñosas (Zaerr y Mapes, 1982).

- *Agente gelificante (en el caso de medios semisólidos):* El agar (entre 0.6 y 1.0 %) es el compuesto más utilizado. También pueden emplearse Agargel (0.4 a 0.6 %), Transfergel (2.0 a 2.6 %), Phytigel (0.25 a 0.4 %), agarosa (0.8 a 0.9 %) y Gelrite (0.1 a 0.2 %).
- *Otros compuestos:* Muchas sustancias, de variada composición química, suelen ser adicionadas a los medios básicos. Además de la glicina, otros aminoácidos se pueden agregar a los medios. Es el caso de L-tirosina, asparagina y cisteína, aunque hay que tener presente que en dosis altas pueden inhibir el crecimiento de los cultivos. El carbón activado (0.1 a 5%) suele ser incorporado al medio, dado que es probable que absorba metabolitos tóxicos para los cultivos.

En algunos medios se incorporan ácidos orgánicos como el málico, el cítrico, el pirúvico y el succínico y es frecuente el empleo de L-glutamina y de caseína hidrolizada. También en ocasiones es necesaria la incorporación de agentes antioxidantes (L-cisteína, ácido ascórbico, polivinilpirrolidona) para prevenir el ennegrecimiento tisular causado por la oxidación de polifenoles presentes en los explantes. Este oscurecimiento puede causar la muerte de los mismos.

2.4.4. Condiciones ambientales para la incubación.

La incubación de los cultivos se debe llevar a cabo en condiciones controladas. Por lo menos en lo que se refiere a temperatura, calidad e intensidad de luz, fotoperiodo, humedad atmosférica e higiene. Estas condiciones se logran con el empleo de cámaras climatizadas o cuartos especialmente preparados con aire acondicionado (frío-calor) y una buena y uniforme circulación de aire en el interior. En general, los cultivos son incubados a temperatura constante de 25 a 28°C, con ciclo de luz/oscuridad de 16/8 horas. La luz es generalmente provista por lámparas fluorescentes con una irradiancia de entre 50 y 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. La humedad atmosférica debe ser elevada (80 - 90%) (Mroginski *et al.* 2010).

2.4.5 Aclimatación de las plantas regeneradas *in vitro*.

Durante el período de incubación, los cultivos son expuestos a condiciones ambientales disímiles al ambiente externo. La atmósfera interna se caracteriza por presentar una considerable variación diurna en la concentración de CO₂, humedad relativa elevada, temperatura constante e intensidad lumínica baja. A su vez, el medio de cultivo compuesto por concentraciones elevadas de azúcares, sales y reguladores del crecimiento, sumado a la ausencia de microorganismos, generan anomalías morfológicas, anatómicas y fisiológicas que las plantas deberán corregir cuando son transferidas al ambiente externo. Este período de adaptación al nuevo hábitat es llamado “fase o etapa de aclimatación” (Mroginski *et al.* 2010).

2.5 Cultivo de Callos

Un callo es el crecimiento *in vitro* de una estructura vegetal amorfa, por lo general clorofílica, que se forma a partir de un fragmento de tejido, colocado sobre un soporte sólido con un medio de cultivo adecuado (Steward *et al.*, 1964).

El cultivo de callos se puede dividir en las siguientes etapas:

- a) Inducción. Las células del inóculo inicial comienzan su crecimiento, tanto en número como en tamaño.
- b) Proliferación celular. El tejido calloso aumenta su masa celular al máximo.
- c) Inducción de la diferenciación. Se obtienen meristemos, embriones, tejido vascular, a partir de la masa celular del callo.
- d) Envejecimiento y pérdida de la capacidad de crecimiento acelerado.

La inducción constituye la activación del metabolismo, caracterizándose por un tamaño constante de célula. La duración de esta fase varía con el estado fisiológico de las células del explante, la presencia de fitoreguladores, y con las condiciones físicas y ambientales empleadas en el cultivo. La inducción de tejido calloso se produce cuando la proporción de auxinas es superior a la de citocininas. Las auxinas son las responsables de la aparición de este tipo de tejido, mientras que las citocininas sólo favorecen su proliferación. En ciertas especies la inducción de tejido calloso puede lograrse agregando únicamente auxinas al medio de cultivo (Pérez *et al.*, 1999 – citado por Barrales, 2013).

La dediferenciación y la división celular se definen por los cambios en el tamaño, estructura y metabolismo de las células, siendo su propósito la formación de la estructura vegetal amorfa, es decir el callo mismo. El callo presenta un crecimiento exponencial de naturaleza radial, con una duración aproximada de 3 a 4 semanas antes de alcanzar la fase estacionaria. Por otro lado, en el transcurso del proceso de dediferenciación, las células vegetales conservan la capacidad de mantener activas todas sus funciones metabólicas, de manera indistinta al tejido de su procedencia, llamándose totipotencia a esta condición (Steward *et al.*, 1964).

Otras características importantes, aunque no sean fases o etapas del cultivo *in vitro*, tienen que ver con procesos de naturaleza selectiva, tal como la presencia de grupos celulares que manifiestan variaciones genotípicas y/o fenotípicas, fenómeno conocido como variación somaclonal. Otro asunto relevante que altera las condiciones del cultivo, son la muerte y oxidación de regiones de la estructura callosa, así como la contaminación por el crecimiento y desarrollo de microorganismos (hongos y bacterias, principalmente). Debe mencionarse que la inducción originada a partir de los diferentes tejidos vegetales del explante, permite seleccionar al eventual cultivo celular que exprese *in vitro*, las características deseadas que deberán permanecer estables bajo condiciones nutricionales y ambientales dadas (Murashige, 1962).

2.5.1 Crecimiento de callos y suspensiones celulares

Los cultivos de callos son a menudo de crecimiento lento y heterogéneo debido

fundamentalmente a la disponibilidad vectorial de los nutrientes. Son masas celulares cuya morfología raramente provee características que permitan la selección de líneas de interés (Warren, 1992). Para evitar la falta de nutrientes, los callos deben ser subcultivados a medio fresco en periodos cortos, variables según la especie (30 a 45 días). La tasa de crecimiento y las características de friabilidad dependen de las especies, del balance hormonal, de la concentración de agar, calcio y magnesio y de la intensidad luminosa (Gomez, 1998 – citado por Barrales, 2013).

2.6 Problemas de Oxidación en Explantes

El oscurecimiento de los explantes cultivados *in vitro*, es un fenómeno frecuente en varias especies, especialmente en las leñosas (Azofeifa, 2008). La oxidación u oscurecimiento de tejidos cultivados *in vitro*, se puede definir como la oxidación, por radicales libres, de diferentes componentes celulares, así como, la oxidación de compuestos fenólicos catalizado por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir quinonas, las cuales son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar, generando daño e incluso la muerte celular (Amiot *et al.* 1996, Bray *et al.* 2000).

En el caso particular del cultivo de tejidos *in vitro*, los procesos de oxidación son causados principalmente por el efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia del explante, los cortes que sufre el explante, composición del medio de cultivo, volumen y calidad del frasco de cultivo (Tabiyeh *et al.* 2006, Van Staden *et al.* 2006, Abdelwahd *et al.* 2008).

El establecimiento *in vitro* de tejidos vegetales de algunas especies de plantas, especialmente leñosas, está, en gran medida, limitado por la ocurrencia de oscurecimientos letales en los explantes y en el medio de cultivo. Esto constituye uno de los problemas más serios y frecuentes, desde el inicio y durante el mantenimiento de un tejido cultivado *in vitro* (Laukkanen *et al.* 2000, Murkute y Shanti-Patil 2003, Tang *et al.*, 2004). El desarrollo de este problema está estrechamente relacionado al estrés oxidativo y nitrosativo que sufren las células del explante cultivado. Este fenómeno se produce por el desbalance entre las reacciones prooxidación [excesiva formación de ROS (especies de oxígeno reactivo o intermediarios de oxígeno reactivo) y, o RNS (especies reactivas de nitrógeno) o de naturaleza enzimática] y los mecanismos antioxidantes para detoxificar (antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos), generalmente causado por una generación incrementada de radicales libres (Novoa *et al.* 2001, Turrens 2003).

La toxicidad de los exudados está en relación con el incremento en la producción de compuestos fenólicos ya que estos son oxidados para formar quinonas, debido a la actividad de enzimas oxidativas, y posteriormente polimerizados (Tabiyeh *et al.* 2006). El daño que resulta de la producción de exudados es usualmente más severo durante los estados iniciales de cultivo. El problema tiende a cesar cuando el explante inicia su crecimiento (Azofeifa, 2008).

Aparte del oscurecimiento de explantes, al estrés oxidativo se le ha relacionado con el desencadenamiento de otros desordenes fisiológicos, morfológicos, epigenéticos y genéticos que ocurren en los explantes cultivados, tales como recalcitrancia,

hiperhidricidad, variación somaclonal y habituación (Cassells y Curry 2001, Van Staden *et al.* 2006).

2.6.1 Medidas para manejar el oscurecimiento de los explantes cultivados *in vitro*

Las estrategias para evitar los procesos de oxidación que conllevan al oscurecimiento de los tejidos del explante cultivado *in vitro*, son numerosas. Para empezar, la prevención y disminución de las circunstancias que provocan o estimulan el estrés oxidativo en el explante es el mejor procedimiento para impedir el desencadenamiento de eventos que conllevan a la oxidación del mismo. Cuando el estrés oxidativo no se logra evitar, se puede recurrir a una serie de medidas prácticas (Azofeifa, 2008). En el cuadro 3, se presentan las estrategias generales para evitar o disminuir los procesos de oxidación.

2.6.1.1 Reducción del posible daño durante el establecimiento

El problema de oxidación se puede disminuir reduciendo la duración del proceso de escisión y de esterilización del explante o con la sustitución del agente desinfectante. En algunas especies, este agente es el responsable de acentuar el problema del oscurecimiento (Azofeifa, 2008).

2.6.1.2 Remoción de sustancias fenólicas

La presencia de sustancias fenólicas en el medio de cultivo, liberadas por el

explante, tiene un efecto autocatalítico. Por lo que la remoción y, o dispersión de las mismas se considera un método de control efectivo (George 1996). Esto se puede lograr mediante:

- a) Pretratamientos
- b) Subcultivos frecuentes

Cuadro 3. Estrategias utilizadas en el cultivo *in vitro*, para evitar o disminuir los problemas oxidativos que ocurren en los explantes vegetales.

Nombre de la estrategia
Uso de explantes en estado juvenil o de material en crecimiento activo.
Crecimiento del explante a baja luminosidad o en oscuridad.
Crecimiento del explante en una temperatura baja.
Subcultivos frecuentes.
Cultivo en medio líquido.
Uso de adsorbentes, en la preparación del explante para su cultivo o en el medio de cultivo.
Uso de antioxidantes en la preparación del explante para su cultivo o en el medio de cultivo.
Elección del medio de cultivo.
Elección de los reguladores del crecimiento.
Cambio del potencial osmótico del medio de cultivo.
pH del medio de cultivo bajo.
Inactivación de enzimas.

2.6.1.3 Poda del tejido necrosado y uso de sellos en el explante

Tulecke *et al.* (1988) y George (1996) recomiendan eliminar el tejido lesionado del explante, producido durante la escisión de la planta donadora o al momento de la desinfección, previo a su cultivo. Otro tipo de estrategia implica el uso de sellos en las áreas cortadas de los explantes (Azofeifa, 2008).

2.6.1.4 Estado físico y volumen del medio de cultivo

Con frecuencia, los explantes son menos propensos al oscurecimiento si inicialmente se establecen en un medio de cultivo líquido, ya que, en este estado físico se propicia la dispersión de sustancias tóxicas. En los medios de cultivo sólidos, el agente gelificante favorece la retención de fenoles u otras sustancias dañinas en las inmediaciones del explante (George 1996).

En relación con la cantidad del medio de cultivo, Bhat y Chandel (1991) sugirieron que el volumen que se utiliza de éste en cada recipiente juega un papel importante en el desarrollo del oscurecimiento. Mencionan que en *Dioscorea alata* el oscurecimiento de los explantes fue más severo cuando se trabajó con volúmenes pequeños. Con relación al tipo y calidad del agente gelificante, Finch *et al.* (1992) observaron que el cultivo de brotes apicales de arroz silvestres en un medio de cultivo gelificado con agar desencadena el oscurecimiento de los explantes. Esto no ocurre si el agar es sustituido por agarosa como agente gelificante.

2.6.1.5 Uso de adsorbentes

2.6.1.5.1 Carbón activado (CA). Mediante la adición de CA al medio de cultivo es posible remover compuestos fenólicos. Evitando o disminuyendo el deterioro del explante. El efecto benéfico del CA se atribuye a su capacidad para remover sustancias inhibitorias o tóxicas del medio de cultivo que son producidas durante el autoclavado del medio o liberadas por el explante (Ebert *et al.* 1993, Petersen *et al.* 1999, Bhatia y Ashwath 2008).

2.6.1.5.2 Polivinil pirrolidona (PVP) y polivinil polipirrolidona (PVPP). Tanto el PVP como el PVPP han sido utilizados en la prevención del oscurecimiento de tejidos, ya sea, aplicado como enjuague al explante o mediante su incorporación al medio de cultivo. El PVP se ha aplicado como tratamiento al momento de separar el explante de la planta donadora (Amin y Jaiswal 1988), como pretratamiento anterior o posterior al proceso de desinfección (Gannoun *et al.* 1995, Figueiredo *et al.* 2001). En ambos casos, los explantes son inmersos en la solución de PVP, la cual generalmente se encuentra en agitación durante cierto tiempo. En la mayoría de los casos se utiliza el PVP incorporado al medio de cultivo (Azofeifa, 2008).

2.6.1.6 Modificación de las condiciones ambientales

Los factores ambientales dentro del recipiente de cultivo, en el cuarto de crecimiento o en el que se encuentra la planta donadora, se pueden modificar para evitar los problemas del oscurecimiento en los explantes. El factor ambiental que con mayor frecuencia se modifica es la luz, tanto en su intensidad, calidad o duración. La modificación generalmente la realizan, ya sea, en el ambiente donde crece la planta donadora de los explantes o en el cuarto de crecimiento donde se colocan los explantes luego de su cultivo (Azofeifa, 2008):

2.6.1.6.1 Plantas donadoras creciendo en oscuridad.

Algunas investigaciones enfatizan la importancia de aplicar tratamientos al material donante, así como, considerar su origen, a modo de controlar la oxidación.

2.6.1.6.2 Crecimiento de explantes en oscuridad o en baja

irradiancia. La oxidación de explantes, en varias especies vegetales, disminuye o se evita si éstos, luego de su establecimiento *in vitro*, son puestos a crecer en una condición de oscuridad por algunas semanas.

2.6.1.6.3 Tratamientos con baja temperatura. El

oscurecimiento de los tejidos cultivados *in vitro* de algunas especies de plantas se puede disminuir o evitar aplicando a los explantes una temperatura, en el cuarto de crecimiento, ligeramente menor a la normalmente empleada, sin que sea lesiva al explante.

2.6.1.7 Composición del medio de cultivo

2.6.1.7.1 Sales. El oscurecimiento de tejidos es con frecuencia más pronunciado en un tipo de medio de cultivo que en otro, lo que implica que el mismo puede ser causado por el uso inapropiado de alguno de los nutrimentos empleados en el medio. Con frecuencia el oscurecimiento es menor en un medio diluido que en uno alto en sales (Azofeifa, 2008).

2.6.1.7.2 Carbohidratos. Davies (1972) y Lux-Endrich *et al.* (2000) sugieren que los carbohidratos son requeridos para la biosíntesis de compuestos fenólicos. Mencionan respectivamente, que en suspensiones celulares

de rosa y en el cultivo de brotes de manzano, la reducción de los niveles de sacarosa en el medio de cultivo conllevó a decrecer los contenidos de polifenoles presentes en los explantes, por lo que el problema de oxidación disminuyó (Azofeifa, 2008).

2.6.1.7.3 Reguladores del crecimiento. La producción de polifenoles está influenciada por los reguladores del crecimiento agregados al medio de cultivo (George 1996). No obstante, su efecto y relación con el oscurecimiento de explantes no es consistente, pues un mismo regulador que induce oscurecimiento en una especie en otra no tiene igual efecto. Esto se debe, según Van Staden *et al.* (2006) a las diferencias genéticas entre los materiales.

2.6.1.7.4 Auxinas. Baker y Wetzstein (1994) cultivaron cotiledones inmaduros de *Arachis hypogaea* en niveles crecientes de auxinas, sea el ácido naftalenacético (ANA) 20.0 a 50.0 mg L⁻¹, o el 2,4-D 5.0 a 60.0 mg L⁻¹. Estos autores señalan que conforme aumentaron los niveles de auxinas en el medio de cultivo se incrementaron los problemas de oxidación en los explantes (especialmente con el uso del 2,4-D). Mathur (1993) logró la formación de callos de *Nardostachys jatamansi* en un medio MS adicionado con 1.6 µM de ANA. Los callos obtenidos a concentraciones más elevados de ANA mostraron altos niveles de oxidación y muerte de tejidos.

2.6.1.7.5 Citoquininas. A pesar de que el BAP previene o retrasa la degradación de la clorofila, ligado a decrecimientos de clorofilasa, Mg-dequelatasa y peroxidasas (Hörtensteiner 1999, Costa *et al.* 2005, Zavaleta-Mancera *et al.* 2007), su incorporación al medio de cultivo se ha relacionado con decoloraciones y oscurecimiento del explante.

2.6.1.8 Modificación del potencial redox (E_h)

El E_h de una solución acuosa es una medida de su propensión a tomar o dar electrones (es decir a ser reducida u oxidada). Un mayor valor positivo indica un poder oxidante superior y un valor negativo, en concordancia, su poder reductor. El E_h de una solución está afectado por el pH (E_h incrementa con reducciones en el pH), la temperatura, la presión de gases, la concentración de oxígeno disuelto, con la actividad respiratoria de las células o tejidos en crecimiento, entre otros (George 1993).

2.6.1.8.1 Antioxidantes. Un agente antioxidante es un compuesto que inhibe o demora la oxidación de un sustrato propenso al fenómeno. Los antioxidantes incluyen agentes reductores, los cuales pueden remover oxígenos de moléculas e incluso de compuestos que actúan con mecanismos alternativos, tales como capturadores o desactivadores de iones (George 1996, Shao *et al.* 2008).

2.6.1.8.2 Antioxidantes en solución. Para especies forestales, Bonga y Durzan (1982) sugieren el empleo de una solución antioxidante (100.0 mg L⁻¹ de AA + 150.0 mg L⁻¹ de ácido acético) para mantener los explantes recién separados de la planta donadora y hasta su establecimiento. Seneviratne y Wijesekara (1996) encontraron que la aplicación de un pretratamiento de inmersión de explantes de *Hevea brasiliensis* en una solución de AC 50.0 mg L⁻¹ y AA 100 mg L⁻¹ incrementó la oxidación de los mismos.

2.6.1.8.3 Adición de antioxidantes al medio de cultivo. Murashige (1974) señala que en la etapa de establecimiento *in vitro* de los explantes algunas veces es necesario agregar al medio de cultivo un antioxidante que retarde o evite la oxidación, sea del explante o del medio de cultivo (Azofeifa, 2008).

2.6.1.8.4 Otros antioxidantes. La literatura hace referencia a otros antioxidantes utilizados en menor frecuencia los cuales se adicionan al medio de cultivo, algunos de ellos son la cisteína, tirosina, mercaptoetanol, ditiotreitól y tiosulfato de sodio (Azofeifa, 2008).

2.6.1.8.5 Compuestos que pueden inhibir iones metálicos (Agentes quelatantes). Los agentes quelatantes o acomplejantes pueden proporcionar una cierta interferencia a la actividad de enzimas involucradas con el estrés oxidativo. Weinstein *et al.* (1951) descubrieron que el ácido

etilendiaminotetracético (EDTA) inhibió la actividad de la PPO en los tejidos de hoja de girasol cultivados *in vitro*, lo cual sugiere que estos compuestos remueven iones metálicos que son esenciales para la actividad de enzimas oxidasas.

2.6.1.8.6 Reducción de la disponibilidad de oxígeno. La tasa de oscurecimiento del explante también depende del E_h de la superficie cortada del tejido, por lo que se puede esperar que el oscurecimiento se reduzca si se disminuye la exposición del explante al oxígeno. Se menciona, además, que el oxígeno se disuelve rápidamente en la “sopa” celular del explante seccionado cuando este se encuentra expuesto al aire, pero, al estar inmerso en un líquido, la tasa de absorción ocurre más lentamente (George, 1996). Algunas estrategias mencionadas en la literatura, con la finalidad de disminuir el daño oxidativo son: reducir el tiempo entre la obtención del explante y su inmersión en una solución antioxidante o su cultivo definitivo (Navarro 1988, Guerra y Handro 1988), realizar los cortes con el material vegetal inmerso en agua o en alguna solución antioxidante, por ejemplo al momento de separar el explante de la planta donadora (Lidemann *et al.* 1970), finalmente disminuyendo el área de corte en el explante (Ripley y Preece 1986).

2.6.1.9 Fenoles, actividad fenolasa y disponibilidad de sustrato

El oscurecimiento enzimático de los tejidos, causado por la oxidación de compuestos fenólicos para formar quinonas, está principalmente catalizado por las PPOs (Fraignier *et al.* 1995), y la tasa de oxidación fenólica puede ser disminuida mediante una reducción en la actividad de las enzimas oxidativas o mediante la disminución

del sustrato disponible para su oxidación (George 1996).

Como la actividad de las enzimas relacionadas con la biosíntesis y la oxidación de los fenoles puede ser manipulada, y disminuye en ausencia de luz, en diversos estudios (Villalobos y Arias 1987, Marks y Simpson 1990, Pirela 2002, Sudripta *et al.* 1996, Seneviratne y Wijesekara 1996, León *et al.* 1997), se incluyó el acondicionamiento del material donante o de los explantes establecidos *in vitro* a crecimiento en oscuridad durante cierto tiempo a fin de lograrlo. Asimismo, Ichihashi y Kako (1977) plantean la alteración del pH del medio de cultivo como una forma de reducir la actividad de las PPOs, la cual es muy importante a un pH de 6,5, y decrece a pH menores.

2.6.1.10 Material donante

Diferentes factores como el genotipo, la ubicación, el tipo y tamaño del explante, la edad, así como la época del año en que se toma el material de la planta donadora influyen en los problemas del oscurecimiento.

La oxidación del tejido y el grado de inhibición del crecimiento en el explante son muy dependientes del genotipo. Esto es especialmente cierto en aquellos géneros de plantas (por ejemplo: *Castanea*, *Hamamelis*, *Juglans*, *Quercus*, *Paeonia*, *Rhododendro*, y muchas coníferas) que naturalmente contienen altos niveles de taninos u otros hidroxifenoles, y que presentan mayor tendencia a que los tejidos cultivados *in vitro* se oxiden (George 1996). Muchas veces se encuentran diferencias

entre especies del mismo género (Huang *et al.* 2002) e incluso cultivares de una misma especie.

Respecto a la ubicación de los explantes en la planta donadora, en el cultivo *in vitro* de *Eucalyptus tereticornis*, Das y Mitra (1990) encontraron que las yemas de brotes apicales terminales del tronco principal presentaron mayor propensión a oxidar que sus iguales ubicadas en las ramas laterales basales. En relación al tipo y tamaño de explante, la regeneración en *Syzygium cuminii* se vio limitada por la alta oxidación ocurrida en los brotes apicales y segmentos nodales utilizados como explantes (Yadav *et al.* 1990). Para evitar el problema y contar con material vegetal adecuado para sus investigaciones, debieron utilizar como explante plántulas provenientes de semillas germinadas en condiciones asépticas. George (1996) indica que los tejidos juveniles son menos propensos al oscurecimiento que los tejidos adultos.

Con respecto a la época del año idónea para la toma de material, Das y Mitra (1990) realizaron pruebas durante todo un año, para el cultivo *in vitro* de *Eucalyptus tereticornis*. Encontraron diferencias importantes relativas a su propensión a exudar sustancias fenólicas según la época en que se recolecta el material de la planta donadora.

2.7 Cultivo *in vitro* en Nogal

Renukdas *et al.* (2010) lograron establecer una metodología para la propagación *in vitro* del nogal pecanero, la cual consiste en germinar la semilla *in vitro*, utilizando el

medio WPM adicionado con 17.76 μM BAP, 0.49 μM IBA, sacarosa al 3% y 0.35% de phytigel, para posteriormente tomar segmentos nodales, y colocarlos en medio WPM, con diferentes concentraciones de IBA (4.92, 26.6, 49.2, 98.41, 147.61 y 196.82 μM) o IBA + ANA (2.46:0.54, 2.46:5.37, 0.49:2.69, 4.92:2.69, 0:0.54, 0:2.69, 0:5.37, 0.49:0, 2.46:0, 4.92:0), esto para inducir la formación de raíces; después se colocaron en sustratos de turba, se pasaron a condiciones de invernadero usando un sustrato de perlita y peat moss; emplearon dos variedades “Desirable” y “Cape Fear”, los mejores resultados en cuanto a la obtención de brotes los encontraron al utilizar 13.32 μM de BAP en el medio líquido.

Wetzstein *et al.* (1990), observaron mayor embriogénesis cuando utilizaron embriones inmaduros de 15 semanas post-polinización, época en la cual corresponde al período de expansión del cotiledón; también citaron que los niveles de ANA más bajos que emplearon (32.2 μM), arrojaron resultados más favorecedores en la formación de ápices.

Wood (1982), empleando yemas axilares de nuez provenientes de explantes nodales de plántulas de 4 a 12 semanas de edad, cultivar “Stuart”, fueron inducidas a proliferar primero brotes y luego a elongarlos; encontró que la mejor combinación fue utilizando 3.0 mg L^{-1} de ácido Giberélico y 0.1 mg L^{-1} de BA.

Obeidy y Smith (1993) indujeron la formación de raíces adventicias a partir de segmentos de cotiledones suplementados con 50.0 μM de ANA, posteriormente, utilizando 20.0 μM de BA y 5.0 μM de IBA, estimularon la formación de brotes.

Por su parte, Hansen y Lazarte (1984) utilizaron segmentos provenientes de plántulas de dos meses de emergencia, los cuales se colocaron en medio líquido WPM suplementado con 3.0 mg L^{-1} de BA para la formación de brotes, después se cambiaron a un medio adicionado con 1.0 a 3.0 mg L^{-1} de IBA para la inducción a la formación de raíces; después, colocaron las vitro plantas, en 10.0 mg L^{-1} de IBA durante ocho días, de este modo lograron aclimatar las plantas regeneradas a condiciones de invernadero.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización del Experimento

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía Unidad Marín de la Universidad Autónoma de Nuevo León de enero del 2012 a enero del 2014. La colecta de material vegetal se realizó a partir de plántulas germinadas en cajas magenta, plántulas de 1 mes de edad extraídas de campo, plántulas con 3 meses de edad y árboles juveniles de 2 años (Figura 1).

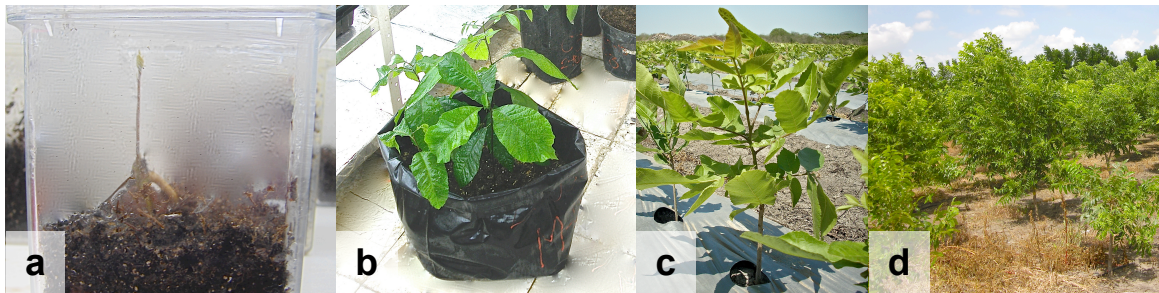


Figura 1. Plantas donadoras de material vegetal a) plántulas provenientes de semillas criollas germinadas en cajas magenta, b) plántulas de 3 meses de edad provenientes de semillas criollas sembradas en bolsas establecidas en el laboratorio, c) plántulas de 1 mes en campo d) árboles criollos juveniles de 2 años.

3.2 Primer Experimento

El primer experimento se realizó con la finalidad de analizar diferentes concentraciones y tiempos en cloruro de sodio, además, se intentó probar si la oxidación disminuía dejando el material vegetal mayor tiempo en antioxidante. Para este experimento se utilizó material vegetal proveniente de plantas juveniles de 2 años de edad, nogales criollos localizados en el municipio de Montemorelos Nuevo León; para la extracción del material vegetal se cortaron varetas de 40 cm de longitud y las hojas no se le removieron, debido a que los explantes a utilizar fueron hojas y yemas (Figura 1d, pag. 38).

3.2.1 Pretratamiento de las plantas en campo

Con la finalidad de ayudar a disminuir la contaminación y oxidación de los explantes, un día antes de la colecta y después del corte del material vegetal se asperjaron los árboles con una solución que contenía 1.0 g L^{-1} del fungicida Ridomil Gold ® MZ 68 WP (Syngenta) (Metalaxil-M: (R)-2-[(2,6-dimetilfenil)-metoxiacetilamino]-ácido propiónico metil éster) y 500 mg L^{-1} de ácido ascórbico, posteriormente se envolvieron en papel periódico y plástico para su traslado.

3.2.2 Predesinfección de los explantes

La predesinfección utilizada consistió en seleccionar material vegetal en óptimas condiciones, folíolos completos sin daños aparentes, vigorosos, de buen porte y

representativos del material criollo original. Todo el material vegetal colectado se lavó con jabón líquido y agua corriente. Después del lavado, se colocó el material en una solución con 2.0 g L^{-1} de Ridomil®, se retiró la solución, se enjuagó con agua corriente en tres ocasiones y posteriormente se colocaron en una solución compuesta por 400 mg L^{-1} de ácido ascórbico, 150 mg L^{-1} de ácido cítrico, 2.5 mL L^{-1} de PPM (Plant Preservative Mixture) y 1.0 g L^{-1} de Ridomil®, se pasaron por una bomba de vacío durante 3 min, posterior a esto, permanecieron 24 h en agitación continua.

3.2.3 Desinfección de los explantes

Este proceso se realizó en condiciones de asepsia bajo una campana de flujo laminar; primero se sumergió el material en alcohol al 70% v/v por 1 min, posterior a esto se realizaron 6 tratamientos con hipoclorito de sodio al 0.54 %, 0.81 % y 1.08 % (10 %, 15 % y 20 % v/v Cloralex®) por 5 y 10 min, a dichas disoluciones se les agregó 3 gotas de Tween-20 y 3 de bactericida vegetal por cada 100 mL de solución, después se realizaron 3 enjuagues con agua bidestilada estéril por 1, 3 y 5 min respectivamente y en agitación continua, y permanecieron en antioxidante hasta el momento de la siembra, el cual contenía 500 mg L^{-1} de ácido ascórbico y 200 mg L^{-1} de ácido cítrico. La mitad del material se estableció inmediatamente después de la desinfección, permaneciendo en el antioxidante de 30 min a 1 h y la otra mitad permaneció 24 h más en antioxidante.

3.2.4 Siembra

Los cortes de los explantes se realizaron bajo la solución antioxidante; los explantes tipo hoja se cortaron en láminas de 1.0 cm^2 (Figura 2b), y las yemas (Figura 3), debido a que provenían de árboles juveniles de 2 años, se colectaron cortando la corteza de la vareta 1.0 cm por encima y 1.0 cm por debajo de la yema y el explante quedaba en forma rectangular. El medio de cultivo utilizado fue Agua Agar al cual se le agregó 12 g L^{-1} de Agargel, se adicionó con 30.0 g L^{-1} de sacarosa, se ajustó el pH a 5.7 ± 0.02 usando 1N KOH o HCl, y se esterilizó por 20 min a 121°C y a 1.5 atm . Los frascos con medio y explantes se mantuvieron en condiciones de completa oscuridad a $26^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ en una caja oscura tapada que no permitía el paso de luz.

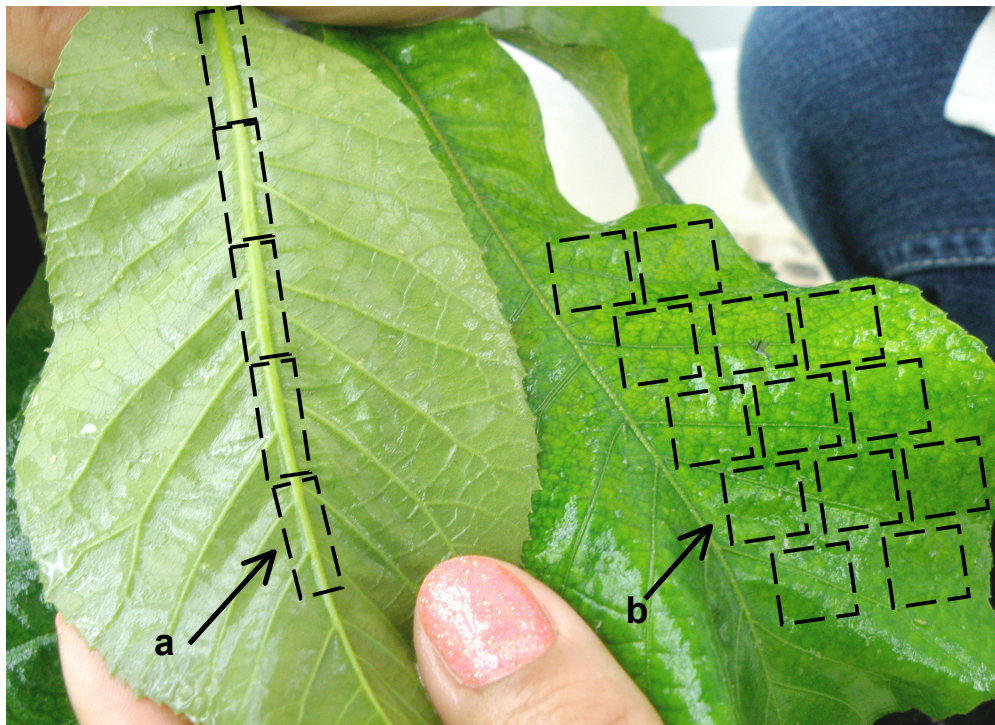


Figura 2. Explantes tipo hoja y nervadura a) corte de nervadura y b) corte de láminas de hoja.

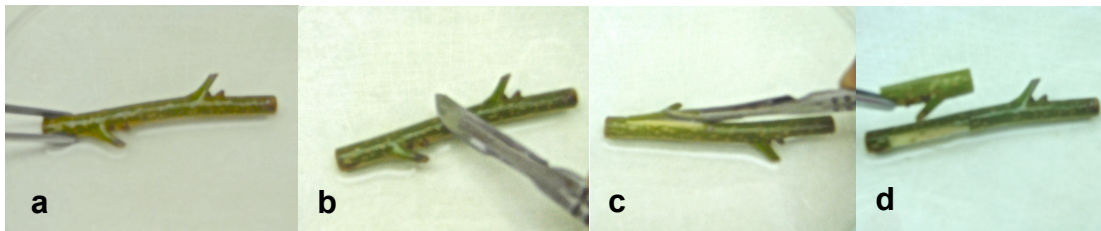


Figura 3. Extracción de yema para explante. a) segmento de vareta con 2 yemas b) corte superior para extraer yema c) corte lateral y desprendimiento de la yema. d) extracción de yema.

3.2.5 Diseño experimental

El diseño experimental que se utilizó para el primer establecimiento fue un completamente al azar con arreglo factorial $2 \times 6 \times 2$, donde el factor A fueron los tipos de explante ya sea hoja o nervadura, el factor B la concentración y tiempo en hipoclorito de sodio al 0.54 %, 0.81 % y 1.08 % (10 %, 15 % y 20 % v/v Cloralex®) por 5 y 10 min, y el factor C fue el tiempo en que los explantes permanecieron en antioxidante antes de la siembra, ya sea 30 min o 24 h, teniendo un total de 24 tratamientos, T1, T3, T5, T7, T9 y T11 fueron conformados por 10 repeticiones, T2, T4, T6, T8, T10, T12, T13, T15, T17, T18, T19, T21 y T23 por 5 repeticiones, T20 y T24 por 4 y T14, T16 y T22 por 3, cada repetición contenía 4 explantes. La manera de tomar los datos consistió en que si un explante presentaba oxidación en más del 90% se consideraba una oxidación del 25 %, si dos se mostraban así, era un 50% de oxidación y así sucesivamente, lo mismo sucedió con la contaminación, en donde se contabilizó el numero de explantes con contaminación y se expresó como porcentaje, teniendo como posibles resultados: 0 %, 25 %, 50 %, 75 % o 100 %.

Los análisis estadísticos se realizaron considerando como factores a las semanas, tratamientos de cloro y antioxidantes para el caso del explante de hojas. Fue necesario transformar el porcentaje de contaminación por bacterias y hongos y oxidación por medio del $\text{ArcSeno}\sqrt{\%}$. La duración del experimento fue de cinco semanas. En el caso del explante de yema no se analizó estadísticamente debido a que en la primera semana se contaminó todo el material.

3.3 Segundo Experimento

Debido a que las hojas son más sensibles al hipoclorito de sodio, en este experimento se utilizó la dosis más baja anteriormente probada, en cuanto a las yemas, se utilizaron las cuatro concentraciones de hipoclorito de sodio menos agresivas. El material vegetal utilizado en el experimento provenía de plantas juveniles de 2 años de edad, nogales criollos localizados en el municipio de Montemorelos Nuevo León; para la extracción del material vegetal se cortaron varetas de 40 cm de longitud y las hojas no se le removieron, debido a que los explantes a utilizar fueron hojas y yemas (Figura 1d, pag. 38).

3.3.1 Pretratamiento de las plantas en campo

Cuatro días antes de la colecta se asperjaron los árboles con una solución que contenía 1.0 g L^{-1} de Ridomil® y 500 mg L^{-1} de ácido ascórbico, después del corte, se asperjaron las varetas con 150 mg L^{-1} de ácido cítrico posteriormente se envolvieron en papel periódico y plástico para su traslado al laboratorio.

3.3.2 Predesinfección de los explantes

La pre-desinfección utilizada consistió en seleccionar material vegetal en óptimas condiciones, folíolos completos sin daños aparentes, vigorosos, de buen porte y representativos del material criollo original. Todo el material vegetal colectado se lavó con jabón líquido y agua corriente. Después del lavado, se colocó el material en una solución con 2 g L^{-1} de Ridomil®, se retiró la solución, se enjuagó con agua corriente en tres ocasiones y posteriormente se colocaron en una solución compuesta por 400 mg L^{-1} de ácido ascórbico, 150 mg L^{-1} de ácido cítrico, 2.5 mL L^{-1} de PPM y 1.0 g L^{-1} de Ridomil®, se pasaron por una bomba de vacío durante 3 min, posterior a esto, permanecieron 24 h en agitación continua.

3.3.3 Desinfección de los explantes

Este proceso se realizó en condiciones de asepsia bajo una campana de flujo laminar; primero se sumergió el material en alcohol al 70 % v/v por 1 min, posterior a esto se realizaron 4 tratamientos con hipoclorito de sodio al 0.54 % y 0.81 % (10 % y 15 % v/v Cloralex®) por 5 y 10 min (esto para yemas, en hojas se utilizó únicamente la combinación más baja), a dichas disoluciones se les agregó 3 gotas de Tween-20 y 3 de bactericida vegetal por cada 100 mL de solución, después se realizaron 3 enjuagues con agua bidestilada estéril por 1, 3 y 5 min respectivamente y en agitación continua, y permanecieron en antioxidante hasta el momento de la siembra, el cual contenía 500 mg L^{-1} de ácido ascórbico y 200 mg L^{-1} de ácido cítrico. La mitad de las yemas se establecieron después de la desinfección y la otra mitad permaneció

24 h más en la solución antioxidante, las hojas no permanecieron en antioxidante 24 h.

3.3.4 Siembra

Los explantes utilizados fueron de tipo hoja y yema, los de hoja se cortaron en láminas de 1.0 cm^2 (Figura 2b), y las yemas (Figura 3), debido a que provenían de árboles juveniles de 2 años, se colectaron cortando la corteza de la vareta 1.0 cm por encima y 1.0 cm por debajo de la yema y el explante quedaba en forma rectangular. Las láminas de hoja se establecieron en medio WPM con las hormonas ANA y 2-4,D la concentración de las mismas se muestra en el Cuadro 4, las yemas que se pasaron por antioxidante se establecieron en medio MS sin hormonas y las yemas que se dejaron 24 h en antioxidante se establecieron en el medio Agua Agar al que se le agregó 12.0 g L^{-1} de Agargel, a los medios MS y WPM se gelificaron con 4.0 g L^{-1} de Phytigel™ (Sigma, P8169). Todos se adicionaron con 30.0 g L^{-1} de sacarosa, se ajustó el pH a 5.7 ± 0.02 usando 1N KOH o HCl, y se esterilizaron por 20 min a 121°C y a 1.5 atm. Los frascos con medio y explantes se mantuvieron en condiciones de completa oscuridad a $26^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ en una caja oscura tapada que no permitía el paso de luz.

3.3.5 Diseño experimental

En el segundo experimento se utilizó un diseño completamente al azar con 12 tratamientos y 4 repeticiones, cada repetición estaba constituida por 4 explantes, en el Cuadro 5 se muestran los tratamientos establecidos para este experimento. Los explantes con una oxidación o contaminación mayor al 90% se consideraban como oxidados o contaminados y en cada unidad experimental se contabilizó el número de explantes afectados, teniendo como posibles resultados 0 %, 25 %, 50 %, 75 % o 100 %. Para realizar los análisis estadísticos fue necesario realizar la transformación de datos de porcentaje de oxidación y contaminación al $\text{ArcSeno}\sqrt{\frac{\%}{100}}$. Dichos análisis se realizaron considerando como factores a las semanas, tratamientos con hipoclorito de sodio (cloro) y antioxidantes.

El experimento tuvo una duración de cuatro semanas, las unidades experimentales que contenían como explante hojas, solo permanecieron dos semanas, después de aquí se eliminaron por exceso de oxidación, el resto de las unidades experimentales contenían explantes de tipo yema, sin embargo, T5, T6, T7 y T8 permanecieron tres semanas, después se eliminaron también por altos problemas de oxidación y contaminación bacteriana, a esta fecha, los T9, T10, T11 y T12 tenían igualmente problemas por contaminación bacteriana, pero la oxidación no fue tan marcada hasta la siguiente semana. Se realizó un análisis de varianza (SPSS 20.0) para ver si existió diferencia significativa hasta la tercera semana dentro de los explantes de tipo yema, posterior a esto, se realizó una comparación de medias DMS (Paquete estadístico de la FAUANL. Olivares, 2013)

Cuadro 4. Concentración de reguladores de crecimiento para el medio WPM utilizado en el segundo establecimiento.

	NAA (mg L ⁻¹)		2-4,D (mg L ⁻¹)	
	3	5	1	2
WPM 1	*		*	
WPM 2	*			*
WPM 3		*	*	
WPM 4		*		*

Cuadro 5. Tratamientos evaluados en el segundo experimento

Tratamiento	Explante	Hipoclorito de sodio / tiempo	Tiempo en antioxidante	Medio de cultivo
1	Hoja	0.54 % - 5 min	30 min	WPM 1*
2	Hoja	0.54 % - 5 min	30 min	WPM 2*
3	Hoja	0.54 % - 5 min	30 min	WPM 3*
4	Hoja	0.54 % - 5 min	30 min	WPM 4*
5	Yema	0.54 % - 5 min	30 min	MS
6	Yema	0.54 % - 10 min	30 min	MS
7	Yema	0.81 % - 5 min	30 min	MS
8	Yema	0.81 % - 10 min	30 min	MS
9	Yema	0.54 % - 5 min	24 h	AA
10	Yema	0.54 % - 10 min	24 h	AA
11	Yema	0.81 % - 5 min	24 h	AA
12	Yema	0.81 % - 10 min	24 h	AA

* La concentración de los reguladores de crecimiento se muestran en el Cuadro 4

3.4 Tercer Experimento

Con la finalidad de bajar los índices de contaminación se modificó la solución pre desinfectante para este establecimiento. En este experimento se utilizó material

vegetal proveniente de plantas juveniles de 2 años de edad, nogales criollos localizados en el municipio de Montemorelos Nuevo León; para la extracción del material vegetal se cortaron varetas de 40 cm de longitud y las hojas no se le removieron, debido a que los explantes a utilizar serían hojas y yemas (Figura 1d, pag. 38).

3.4.1 Pretratamiento de las plantas en campo

Cuatro días antes de la colecta se asperjaron los árboles con una solución que contenía 1.0 g L^{-1} de Ridomil® y 500 mg L^{-1} de ácido ascórbico, después del corte, se asperjaron las varetas con 150 mg L^{-1} de ácido cítrico posteriormente se envolvieron en papel periódico y plástico para su traslado al laboratorio.

3.4.2 Predesinfección de los explantes

La predesinfección utilizada consistió en seleccionar material vegetal en óptimas condiciones, folíolos completos sin daños aparentes, vigorosos, de buen porte y representativos del material criollo original. Todo el material vegetal colectado se lavó con jabón líquido y agua corriente. Después del lavado, se colocó el material en una solución con 2.0 g L^{-1} de Ridomil®, se enjuagó con agua corriente en tres ocasiones y posteriormente se colocaron en una solución compuesta por 700 mg L^{-1} de ácido ascórbico, 300 mg L^{-1} de ácido cítrico, 3.5 mL L^{-1} de PPM, 1.0 g L^{-1} de Ridomil® y 5.0 mL L^{-1} del Fungicida y Bactericida enzimático BioFyB ® (BIOAGROMEX S. A. DE

C.V.), se pasaron por una bomba de vacío durante 3 min, posterior a esto, las hojas permanecieron 24 h en agitación continua y las yemas 48 h.

3.4.3 Desinfección de los explantes

Este proceso se realizó en condiciones de asepsia bajo una campana de flujo laminar; primero se sumergió el material en alcohol al 70 % v/v por 1 min, posterior a esto se realizaron 4 tratamientos con hipoclorito de sodio al 0.54 % y 0.81 % (10 % y 15 % v/v Cloralex®) por 5 y 10 min, a dichas disoluciones se les agregó 3 gotas de Tween-20 ® y 3 de bactericida vegetal por cada 100 mL de solución, después se realizaron 3 enjuagues con agua bidestilada estéril por 1, 3 y 5 min respectivamente y en agitación continua, y permanecieron en antioxidante hasta el momento de la siembra, el cual contenía 600 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, 300 mg L⁻¹ de ácido cítrico y 4.0 mL L⁻¹ de PPM. La mitad del material se estableció después de la desinfección y la otra mitad permaneció 24 h más en la solución antioxidante.

3.4.4 Siembra

Los cortes de los explantes se realizaron bajo la solución antioxidante; los explantes tipo hoja se cortaron en láminas de 1.0 cm² (Figura 2b), y las yemas (Figura 3), debido a que provenían de árboles juveniles de 2 años, se colectaron cortando la corteza de la vareta 1.0 cm por encima y 1.0 cm por debajo de la yema y el explante quedaba en forma rectangular. El medio de cultivo utilizado fue WPM con 3.0 mg L⁻¹ de ANA, 1.25 mg L⁻¹ de 2-4,D al cual se le agregó para gelificar 4.0 g L⁻¹ de

Phytigel™ (Sigma, P8169), se adicionó con 30.0 g L⁻¹ de sacarosa, se ajustó el pH a 5.7 ± 0.02 usando 1N KOH o HCl, y se esterilizó por 20 min a 121°C y a 1.5 atm. Los frascos con medio y explantes se mantuvieron en condiciones de completa oscuridad a $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en una caja oscura tapada que no permitía el paso de luz.

3.4.5 Diseño experimental

En el tercer experimento se utilizó un diseño completamente al azar con 16 tratamientos y 8 repeticiones, cada unidad experimental contenía 4 explantes, en el Cuadro 6 se muestran los tratamientos evaluados para este experimento. La forma de tomar los datos consistió en que se evaluó visualmente la porción del explante la cual presentaba la afectación, ya sea por oxidación o por contaminación fúngica o bacteriana y se sumaba el porcentaje de cada explante por unidad experimental. Para realizar los análisis estadísticos fue necesario realizar la transformación de datos de porcentaje de oxidación y contaminación al $\text{ArcSeno}\sqrt{\%}$.

La duración real de este experimento fue de seis semanas, sin embargo se evaluó hasta la segunda semana debido a que hasta este momento aún se contó con todas las unidades experimentales, después de esta fecha se eliminaron las unidades experimentales que presentaban problemas por contaminación, así hasta que se eliminaron todos los frascos. Los análisis estadísticos se realizaron considerando como factores a las semanas, tipos de explantes, tratamientos con hipoclorito de sodio (cloro) y antioxidantes. Donde se realizó un análisis de varianza (SPSS 20.0)

para ver si existió diferencia significativa, posterior a esto, se realizó una comparación de medias DMS (Paquete estadístico de la FAUANL. Olivares, 2013).

Cuadro 6. Tratamientos evaluados en el tercer experimento

Tratamiento	Explante	Tiempo en pre-desinfección	Hipoclorito de sodio / tiempo	Tiempo en antioxidante
1	Hoja	24 h	0.54 % - 5 min	30 min
2	Hoja	24 h	0.54 % - 10 min	30 min
3	Hoja	24 h	0.81 % - 5 min	30 min
4	Hoja	24 h	0.81 % - 10 min	30 min
5	Hoja	24 h	0.54 % - 5 min	24 h
6	Hoja	24 h	0.54 % - 10 min	24 h
7	Hoja	24 h	0.81 % - 5 min	24 h
8	Hoja	24 h	0.81 % - 10 min	24 h
9	Yema	48 h	0.54 % - 5 min	30 min
10	Yema	48 h	0.54 % - 10 min	30 min
11	Yema	48 h	0.81 % - 5 min	30 min
12	Yema	48 h	0.81 % - 10 min	30 min
13	Yema	48 h	0.54 % - 5 min	24 h
14	Yema	48 h	0.54 % - 10 min	24 h
15	Yema	48 h	0.81 % - 5 min	24 h
16	Yema	48 h	0.81 % - 10 min	24 h

3.5 Cuarto Experimento

Con el propósito de erradicar los problemas por contaminación en el presente experimento se probaron una serie de soluciones pre desinfectantes en donde se sometieron los explantes en diferentes tiempos, además se trató de disminuir los

problemas por oxidación donde la mitad de material no se sumergió en alcohol como parte del tratamiento de desinfección. Aquí se utilizó material vegetal proveniente de plantas juveniles de 2 años de edad, nogales criollos localizados en el municipio de Montemorelos Nuevo León; para la extracción del material vegetal se cortaron varetas de 40 cm de longitud y las hojas no se le removieron, debido a que los explantes a utilizar serían hojas y yemas (Figura 1d, pag. 38).

3.5.1 Pretratamiento de las plantas en campo

Cuatro días antes de la colecta se asperjaron los árboles con una solución que contenía 1.0 g L^{-1} de Ridomil® y 500 mg L^{-1} de ácido ascórbico, después del corte, se asperjaron las varetas con 150 mg L^{-1} de ácido cítrico posteriormente se envolvieron en papel periódico y plástico para su traslado al laboratorio.

3.5.2 Predesinfección de los explantes

La predesinfección utilizada consistió en seleccionar material vegetal en óptimas condiciones, folíolos completos sin daños aparentes, vigorosos, de buen porte y representativos del material criollo original. Todo el material vegetal colectado se lavó con jabón líquido y agua corriente. Después del lavado se colocó el material en cuatro diferentes soluciones antifúngicas, antibacterianas y antioxidantes por 30 min o 12 h, teniendo un total de 8 tratamientos de predesinfección. Los productos y concentraciones de las mismas se muestran en la Cuadro 7 .

Cuadro 7. Productos y concentraciones utilizados para la predesinfección del cuarto experimento.

	Producto						
	BIOMYCIN® (g L ⁻¹) ¹	Cuperhidro® * (mL L ⁻¹) ²	RIDOMIL® (g L ⁻¹) ³	AMISTAR® (g L ⁻¹) ⁴	ANTRAK® (g L ⁻¹) ⁵	Acido Ascórbico (g L ⁻¹)	Acido. Cítrico (g L ⁻¹)
T ₁	4.0	2.0	1.0	1.0	1.0	0.400	0.400
T ₂	4.0	4.0	0.0	1.0	2.0	0.400	0.400
T ₃	4.0	0.0	1.0	1.0	2.0	0.400	0.400
T ₄	4.0	0.0	0.0	3.0	3.0	0.400	0.400

*ARYSTA- Grupo Bioquímico Mexicano (ARYSTA-GBM)

(1) Oxitetraciclina, (2) Hidróxido cúprico, (3) Metalaxil-M: (R)-2-[(2,6-dimetilfenil)-metoxiacetilamino]-ácido propiónico metil éster, (4) Azoxistrobina : (E)-2-{2-[6-(2-cianofenoxy)pirimidin-4-iloxy]fenil}-3-metoxiacrilato de metilo; y Difenconazol: 3-cloro-4-[(2RS,4RS;2RS,4SR)-4-metil-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-2-il] fenil-4-clorofenil éter, (5) Benomilo: Metil 1-(butilcarbamoil)bencimidazol-2- il carbamato.

3.5.3 Desinfección de los explantes

Este proceso se realizó en condiciones de asepsia bajo una campana de flujo laminar; se sumergió la mitad del material de cada uno de los ocho tratamientos de pre desinfección (Cuadro 7) en alcohol al 70% v/v por 1 min, la otra mitad no se sumergió en alcohol, posterior a esto se realizaron 2 tratamientos con hipoclorito de sodio al 0.54 % y 0.81 % (10 % y 15 % v/v Cloralex®) por 5 y 10 min respectivamente, a dichas disoluciones se les agregó 3 gotas de Tween-20 ® y 3 de bactericida vegetal por cada 100 mL de solución, después se realizaron 3 enjuagues con agua bidestilada estéril por 1, 3 y 5 min respectivamente y en agitación continua, y permanecieron en antioxidante hasta el momento de la siembra el cual contenía 600 mg L⁻¹ de ácido ascórbico y 300 mg L⁻¹ de ácido cítrico. Después de los tratamientos de predesinfección y desinfección, se obtuvieron 32 tratamientos (Cuadro 8).

3.5.4 Siembra

Los cortes de los explantes se realizaron bajo la solución antioxidante; los explantes tipo hoja se cortaron en láminas de 1.0 cm^2 (Figura 2b), y las yemas (Figura 3), debido a que provenían de árboles juveniles de 2 años, se colectaron cortando la corteza de la vareta 1.0 cm por encima y 1.0 cm por debajo de la yema y el explante quedaba en forma rectangular.. El medio de cultivo utilizado fue WPM con 3.0 mg L^{-1} de ANA, 1.25 mg L^{-1} de 2-4,D al cual se le agregó 4.0 g L^{-1} de Phytigel™ (Sigma, P8169) como gelificante, se adicionó con 30.0 g L^{-1} de sacarosa, se ajustó el pH a 5.7 ± 0.02 usando 1N KOH o HCl, y se esterilizó por 20 min a 121°C y a 1.5 atm. Los frascos con medio de cultivo y explantes se mantuvieron en condiciones de completa oscuridad a $26^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ en una caja oscura tapada que no permitía el paso de luz.

3.5.5 Diseño experimental

En el experimento número cuatro, el modelo estadístico a utilizarse fue un completamente al azar con arreglo factorial $2 \times 4 \times 2 \times 2 \times 2$, donde el factor A fueron los tipos de explante, siendo hoja o yema, el factor B consistió en la concentración de la solución predesinfectante, el factor C el tiempo en la solución ya sea 30 min o 24 h, el factor D si pasaron o no por alcohol en la desinfección y el factor E el tiempo y concentración en hipoclorito de sodio al 0.54 % y 0.81 % (10 % y 15 % v/v Cloralex®) por 10 y 5 min respectivamente, teniendo un total de 64 tratamientos con 2 repeticiones por tratamiento y cada unidad experimental contenía 4 explantes. Los

tratamientos se pueden observar en el Cuadro 8. La forma de tomar los datos consistió en que se evaluó visualmente la porción del explante la cual presentaba la afectación, ya sea por oxidación o por contaminación fúngica o bacteriana, se sumaba el porcentaje de cada explante por unidad experimental y fue el valor que se le daba. Para hacer los análisis estadísticos fue necesario realizar la transformación de datos de porcentaje de oxidación y contaminación al $\text{ArcSeno}\sqrt{\%}$.

La duración real de este experimento fue de seis semanas, sin embargo se evaluó hasta la segunda semana debido a que hasta este momento aún se contó con todas las unidades experimentales, después de esta fecha se eliminaron los que presentaban problemas por contaminación. Dichos análisis se efectuaron considerando como factores a las semanas, tipos de explantes, pretratamientos, tiempo en el pretratamiento, si se sometieron o no al alcohol y tratamientos con hipoclorito de sodio (cloro). Se hizo un análisis de varianza (SPSS 20.0) para ver si existió diferencia significativa, posterior a esto, se realizó una comparación de medias DMS (Paquete estadístico de la FAUANL. Olivares, 2013).

3.6 Quinto Experimento

En este experimento se optó por cambiar la planta donadora del material por plántulas, debido a las altas tasas de oxidación y contaminantes, además se utilizó la dosis más baja de hipoclorito de sodio en 2 tiempos, esto para la desinfección, y se utilizaron otros explantes. El material vegetal donante que se utilizó fueron plántulas

Cuadro 8. Tratamientos del cuarto experimento, donde se combinan tiempo de desinfección y sustancias utilizadas en la desinfección (alcohol e hipoclorito de sodio).

Tratamiento de predesinfección*	TIEMPO (predesinfección)	Alcohol (70 % v/v - 1 min)	Hipoclorito de sodio	Tratamiento **
P1	12 h	Si	0.54 % - 10 min	1
P1	12 h	Si	0.81 % - 5 min	2
P1	12 h	No	0.54 % - 10 min	3
P1	12 h	No	0.81 % - 5 min	4
P1	30 min	Si	0.54 % - 10 min	5
P1	30 min	Si	0.81 % - 5 min	6
P1	30 min	No	0.54 % - 10 min	7
P1	30 min	No	0.81 % - 5 min	8
P2	12 h	Si	0.54 % - 10 min	9
P2	12 h	Si	0.81 % - 5 min	10
P2	12 h	No	0.54 % - 10 min	11
P2	12 h	No	0.81 % - 5 min	12
P2	30 min	Si	0.54 % - 10 min	13
P2	30 min	Si	0.81 % - 5 min	14
P2	30 min	No	0.54 % - 10 min	15
P2	30 min	No	0.81 % - 5 min	16
P3	12 h	Si	0.54 % - 10 min	17
P3	12 h	Si	0.81 % - 5 min	18
P3	12 h	No	0.54 % - 10 min	19
P3	12 h	No	0.81 % - 5 min	20
P3	30 min	Si	0.54 % - 10 min	21
P3	30 min	Si	0.81 % - 5 min	22
P3	30 min	No	0.54 % - 10 min	23
P3	30 min	No	0.81 % - 5 min	24
P4	12 h	Si	0.54 % - 10 min	25
P4	12 h	Si	0.81 % - 5 min	26
P4	12 h	No	0.54 % - 10 min	27
P4	12 h	No	0.81 % - 5 min	28
P4	30 min	Si	0.54 % - 10 min	29
P4	30 min	Si	0.81 % - 5 min	30
P4	30 min	No	0.54 % - 10 min	31
P4	30 min	No	0.81 % - 5 min	32

*Los productos y concentraciones empleadas para los tratamientos de predesinfección se muestran en la Cuadro 7.

** Dichos tratamientos se repiten en hojas y yemas

traídas de campo con 1 mes de edad (Figura 1d, pag. 38), los explantes que se emplearon fueron raíz, tallo y nervadura.

3.6.1 Predesinfección de los explantes

La predesinfección utilizada consistió en seleccionar material vegetal en óptimas condiciones, folíolos completos sin daños aparentes, vigorosos, de buen porte y representativos del material criollo original. Todo el material vegetal colectado se lavó con jabón líquido y agua corriente. Después del lavado se mantuvo el material vegetal en agitación continua por 24 h en una solución que contenía 4.0 g L⁻¹ de Biomycin® Agrícola 5% (PASSA), 3.0 g L⁻¹ de Amistar® (Syngenta), 3.0 g L⁻¹ de Antrak® 500 PH (Agroquímica Tridente S. A. de C.V.) y 150 mg L⁻¹ de ácido Cítrico, transcurrido este tiempo y antes de introducir el material a la campana se le dio tres enjuagues con agua corriente.

3.6.2 Desinfección de los explantes

Este proceso se realizó en condiciones de asepsia bajo una campana de flujo laminar; primero se colocó el material vegetal 30 min en una solución preparada con agua bidestilada estéril la cual contenía 1 g L⁻¹ de Bemil®, posterior a esto se enjuagó el material, después se realizaron 2 tratamientos con hipoclorito de sodio al 0.54 % (10 % v/v Cloralex®) por 10 y 15 min, a dichas disoluciones se les agregó 3 gotas de Tween-20® y 3 de bactericida vegetal por cada 100 mL de solución, después se realizaron 3 enjuagues con agua bidestilada estéril por 1, 3 y 5 min

respectivamente y en agitación continua, y permanecieron en antioxidante hasta el momento de la siembra el cual contenía 150 mg L^{-1} de ácido ascórbico.

3.6.3 Siembra

Los cortes de los explantes se realizaron bajo la solución antioxidante; para obtener los explantes tipo nervadura central se cortaba la nervadura y se les dejaba una porción de 1 mm de hoja a los costados en segmentos de 1.5 cm (Figura 2a), los tallos y raíces (Figura 4), también fueron segmentos de 1.5 cm. Se establecieron en los medios MS y WPM suplementados con 3.0 mg L^{-1} de ANA, 1.25 mg L^{-1} de 2-4,D, 100 mg L^{-1} de BEMIL®, 30.0 g L^{-1} de sacarosa, 4.0 g L^{-1} de Phytigel™ se ajustó el pH a 5.7 ± 0.02 usando 1N KOH o HCl, y se esterilizó el medio por 20 min a 121°C y a 1.5 atm. Los frascos con los explantes y medio de cultivo se mantuvieron en condiciones de completa oscuridad a $26^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ en una caja oscura tapada que no permitía el paso de luz.

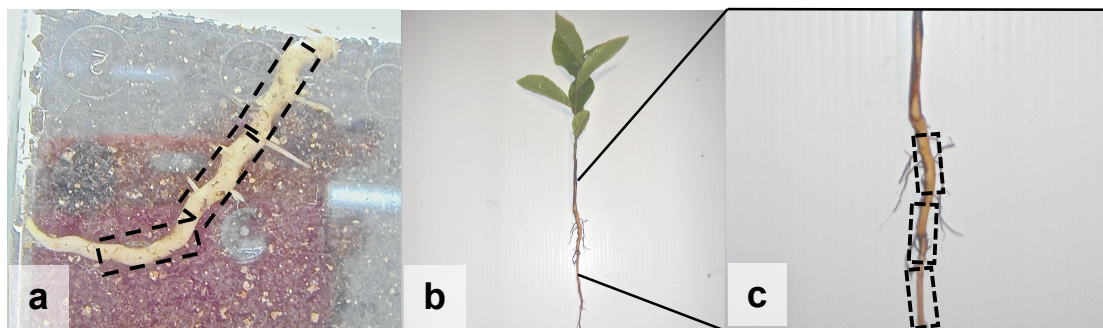


Figura 4. Obtención de explantes de raíz a partir de plántulas de nogal criollo; a) raíz de plántula germinada en caja magenta, b) plántula de nogal criollo de 1 mes de edad extraída de campo abierto c) acercamiento hacia la raíz de la fotografía b, raíz segmentada.

3.6.4 Diseño experimental

En el quinto experimento, se planteó para el modelo estadístico un diseño completamente al azar con arreglo factorial $3 \times 2 \times 2$, donde el factor A consistió en el tipo de explante, siendo tallo, raíz o nervadura, el factor B se basó en el tiempo y concentración en hipoclorito de sodio al 0.54 % (10 % v/v Cloralex®) por 10 y 15 min, y el factor C consistió en el medio utilizado para la siembra, aquí se emplearon las sales del medio MS y del medio WPM, se hicieron 5 repeticiones por cada uno de los 12 tratamientos, y cada repetición tenía 4 explantes. La forma de tomar los datos consistió en que se evaluó visualmente la porción del explante la cual presentaba la afectación, ya sea por oxidación o por contaminación fúngica o bacteriana y se sumaba el porcentaje de cada explante por unidad experimental.

Para realizar los análisis estadísticos fue necesario hacer la transformación de datos de porcentaje de oxidación y contaminación al $\text{ArcSeno}\sqrt{\frac{y}{100}}$. La duración real de este experimento fue de cinco semanas, sin embargo se evaluó hasta la segunda semana debido a que hasta este momento aún se contó con todas las unidades experimentales, después de esta fecha se eliminaron los que presentaban problemas por contaminación, así hasta que se eliminaron todos los frascos. Los análisis estadísticos se realizaron considerando como factores a las semanas, tipos de explantes, tratamientos con hipoclorito de sodio (cloro) y el medio de cultivo donde se establecieron. Donde se realizó un análisis de varianza (SPSS 20.0) para ver si existió diferencia significativa, posterior a esto, se realizó una comparación de medias DMS (Paquete estadístico de la FAUANL. Olivares, 2013).

3.7 Sexto Experimento

En dicho experimento, se utilizó como material vegetal donante plántulas germinadas *in vitro* donde se tomaron algunos explantes de tipo tallo y raíz, además, se trajeron plántulas de campo para tomar explantes tipo nervadura. Esto con la finalidad de descartar problemas causados por oxidación y contaminación. Las semillas de nogal criollo utilizadas se establecieron en condiciones estériles con peat moss en cajas magenta, primero se germinaron y después se extrajeron de las cajas para utilizar el material vegetal tipo tallo y raíz, también se utilizaron plántulas de campo con 1 mes de edad (Figura 1d, pag. 38) para tomar explantes tipo nervadura central.

3.7.1 Predesinfección de los explantes

La pre-desinfección utilizada consistió en seleccionar material vegetal en óptimas condiciones, folíolos completos sin daños aparentes, vigorosos, de buen porte y representativos del material criollo original. Todo el material vegetal colectado se lavó con jabón líquido y agua corriente. Después del lavado se mantuvo el material vegetal en agitación continua por 24 h en una solución que contenía 4.0 g L⁻¹ de Biomicyn®, 3.0 g L⁻¹ de Amistar®, 3.0 g L⁻¹ de Antrak® y 150 mg L⁻¹ de ácido Cítrico, transcurrido este tiempo y antes de introducir el material a la campana se le dio tres enjuagues con agua corriente.

3.7.2 Desinfección de los explantes

Este proceso se realizó en condiciones de asepsia bajo una campana de flujo laminar; primero se colocó el material vegetal 30 min en una solución preparada con agua bidestilada estéril la cual contenía 1 g L^{-1} de Bemil®, posterior a esto se enjuagó el material, después se realizaron 2 tratamientos con hipoclorito de sodio al 0.54 % (10 % v/v Cloralex®) por 10 y 15 min, a dichas disoluciones se les agregó 3 gotas de Tween-20® y 3 de bactericida vegetal por cada 100 mL de solución, después se realizaron 3 enjuagues con agua bidestilada estéril por 1, 3 y 5 min respectivamente y en agitación continua, y permanecieron en antioxidante hasta el momento de la siembra el cual contenía 150 mg L^{-1} de ácido ascórbico.

3.7.3 Siembra

Los cortes de los explantes se realizaron bajo la solución antioxidante; los explantes tipo nervadura central, se cortaba la nervadura y se les dejaba una porción de 1 mm de hoja a los costados en segmentos de 1.5 cm (Figura 2a), los tallos y raíces (Figura 4), también fueron segmentos de 1.5 cm. Se establecieron en el medio WPM suplementado con 3.0 mg L^{-1} de ANA, 1.25 mg L^{-1} de 2-4,D, 100 mg L^{-1} de Bemil®, 30.0 g L^{-1} de sacarosa, 4.0 g L^{-1} de Phytigel™ se ajustó el pH a 5.7 ± 0.02 usando 1N KOH o HCl, y se esterilizó por 20 min a 121°C y a 1.5 atm. Los frascos con medio de cultivo y explantes se mantuvieron en condiciones de completa oscuridad a $26^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ en una caja oscura tapada que no permitía el paso de luz.

3.7.4 Diseño experimental

En el sexto experimento se utilizó un diseño completamente al azar con 6 tratamientos y 5 repeticiones y en cada repetición se colocaron 5 explantes. Para medir la oxidación, contaminación fúngica y contaminación bacteriana, se realizaba una observación y se determinaba el porcentaje dañado por cada explante y se sumaban para dar un solo resultado por cada repetición. En el Cuadro 9 se muestran los tratamientos evaluados para este experimento.

Para realizar los análisis estadísticos fue necesario hacer la transformación de datos de porcentaje de oxidación y contaminación al $\text{ArcSeno}\sqrt{\%}$. La duración real de este experimento fue de tres semanas, sin embargo se evaluó hasta la segunda semana debido a que hasta este momento aún se contó con todas las unidades experimentales, después de esta fecha se eliminaron los que presentaban problemas por contaminación, y para la siguiente semana se eliminó el resto de los frascos por los mismos problemas. Los análisis estadísticos se realizaron considerando como factores a las semanas, tipos de explantes y tratamientos con hipoclorito de sodio (cloro). Donde se realizó un análisis de varianza (SPSS 20.0) para ver si existió diferencia significativa, posterior a esto, se realizó una comparación de medias DMS (Paquete estadístico de la FAUANL. Olivares, 2013).

Cuadro 9. Tratamientos evaluados en el sexto experimento considerando procedencia de planta donadora, tipo de explante y tiempo de desinfección.

Tratamiento	Planta donadora de material vegetal	Explante	Hipoclorito de sodio / tiempo
1	Plántula en caja magenta	Tallo	0.54 % - 10 min
2	Plántula en caja magenta	Tallo	0.54 % - 15 min
3	Plántula en caja magenta	Raíz	0.54 % - 10 min
4	Plántula en caja magenta	Raíz	0.54 % - 15 min
5	Plántula de campo	Nervadura	0.54 % - 10 min
6	Plántula de campo	Nervadura	0.54 % - 15 min

3.8 Séptimo Experimento

Otro modo para suprimir los eminentes problemas por contaminación y oxidación, consistió en germinar y mantener plántulas dentro del laboratorio, con condiciones controladas y realizando aspersiones con fungicidas, bactericidas y antioxidantes, aquí se utilizaron plántulas de dos meses de edad (Figura 1d, pag. 38), germinadas en bolsas plásticas llenas con una mezcla de peat moss y tierra negra las cuales permanecieron en el laboratorio desde el momento de la siembra, los explantes que se emplearon fueron tallo y nervadura.

3.8.1 Acondicionamiento previo *in vivo* de las plántulas

Con la finalidad de ayudar a erradicar la presencia de patógenos y altas tasas de oxidación en los explantes, las plántulas se establecieron y desarrollaron en condiciones homogéneas de fotoperíodo y temperatura, en un lugar cerrado; bajo

estas condiciones, se asperjaron con una solución que contenía 4 g L⁻¹ de Agry-Gent® (Sulfato de Gentamicina y Clorhidrato de Oxitetraciclina), 2 g L⁻¹ de Bemil® y 200 mg L⁻¹ de ácido ascórbico dos veces por semana después de 40 días de la siembra y 3 días consecutivos antes de la colecta para el establecimiento.

3.8.2 Predesinfección de los explantes

La predesinfección utilizada consistió en seleccionar material vegetal en óptimas condiciones, folíolos completos sin daños aparentes, vigorosos, de buen porte y representativos del material criollo original. Todo el material vegetal colectado se lavó con jabón líquido y agua corriente. Después del lavado se sometió por 2 h a una solución que contenía 2 g L⁻¹ de Agry-Gent®, 1.5 g L⁻¹ de Bemil®, 1.5 g L⁻¹ de Amistar®, 400 mg L⁻¹ ácido ascórbico, 150 mg L⁻¹ ácido cítrico y 30 gotas L⁻¹ de bactericida vegetal; después de esto, se le dio 3 enjuagues con agua bidestilada, para posteriormente pasarse a la campana de flujo laminar.

3.8.3 Desinfección de los explantes

Este proceso se realizó en condiciones de asepsia bajo una campana de flujo laminar; se colocó el material vegetal en hipoclorito de sodio al 1.62% (30% v/v Cloralex®) por 15, 20, 25 o 30 min, a dichas disoluciones se les agregó 3 gotas de Tween-20 ® y 3 de bactericida vegetal por cada 100 mL de solución, después se realizaron 3 enjuagues con agua bidestilada estéril por 1, 3 y 5 min

respectivamente y en agitación continua, y permanecieron en antioxidante hasta el momento de la siembra el cual contenía 150 mg L⁻¹ de ácido ascórbico.

3.8.4 Siembra

Los cortes de los explantes se realizaron bajo la solución antioxidante; los explantes tipo nervadura central, se cortaba la nervadura y se les dejaba una porción de 1 mm de hoja a los costados en segmentos de 1.5 cm (Figura 2a), los tallos (Figura 4), también fueron segmentos de 1.5 cm. Se establecieron en el medio Agua Agar suplementado con 500 mg L⁻¹ de Bemil®, 500 mg L⁻¹ de AgryGent®, 30.0 g L⁻¹ de sacarosa, 4.0 g L⁻¹ de Phytigel™ se ajustó el pH a 5.7 ± 0.02 usando 1N KOH o HCl, y se esterilizó por 20 min a 121 °C y a 1.5 atm. Los frascos con medio de cultivo y explantes se mantuvieron en condiciones de completa oscuridad a $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en una caja oscura tapada que no permitía el paso de luz.

3.8.5 Diseño experimental

En el séptimo experimento se utilizó un diseño completamente al azar 2 x 4, donde el factor A consistió en el tipo de explante, tallo o nervadura central, el factor B fue el tiempo que permanecieron los explantes en hipoclorito de sodio al 1.62 % (30 % v/v Cloralex®) ya sea 15, 20, 25 o 30 min, teniendo un total de 8 tratamientos, con 5 repeticiones por cada uno con 5 explantes por unidad experimental. La forma de tomar los datos consistió en que se evaluó visualmente la porción del explante la cual presentaba la afectación, ya sea por oxidación o por contaminación fúngica o

bacteriana, se sumaba el porcentaje de cada explante por unidad experimental y es el valor que se le daba. Para realizar los análisis estadísticos fue necesario hacer la transformación de datos de porcentaje de oxidación y contaminación al $\text{ArcSeno}\sqrt{\%}$.

La duración de este experimento fue de cinco semanas, después de esta fecha se eliminaron los frascos debido a los fuertes problemas de oxidación que se presentaron. Los análisis estadísticos se realizaron considerando como factores a las semanas, tipos de explantes y tratamientos con hipoclorito de sodio (cloro). Donde se realizó un análisis de varianza (SPSS 20.0) para ver si existió diferencia significativa, posterior a esto, se realizó una comparación de medias DMS [Paquete estadístico de la FAUANL (Olivares, 2013)] para ver si resultaron iguales o diferentes.

3.9 Octavo Experimento

Con la finalidad de tener mayor número de explantes, en este experimento se repite lo del anterior. Se utilizaron plántulas de dos meses de edad (Figura 1d, pag. 38), germinadas en bolsas plásticas llenas con una mezcla de peat moss y tierra negra las cuales permanecieron en el laboratorio desde el momento de la siembra; los explantes que se manejaron fueron tallo y nervadura.

3.9.1 Acondicionamiento previo *in vivo* de las plántulas

Con la finalidad de ayudar a erradicar la presencia de patógenos y altas tasas de oxidación en los explantes, las plántulas se establecieron y desarrollaron en

condiciones homogéneas de fotoperíodo y temperatura, en un lugar cerrado; bajo estas condiciones, se asperjaron con una solución que contenía 4 g L⁻¹ de Agry-Gent®, 2 g L⁻¹ de Bemil® y 200 mg L⁻¹ de ácido ascórbico dos veces por semana después de 40 días de la siembra y 3 días consecutivos antes de la colecta para el establecimiento.

3.9.2 Predesinfección de los explantes

La predesinfección utilizada consistió en seleccionar material vegetal en óptimas condiciones, folíolos completos sin daños aparentes, vigorosos, de buen porte y representativos del material criollo original. Todo el material vegetal colectado se lavó con jabón líquido y agua corriente. Después del lavado se sometió por 2 h a una solución que contenía 2 g L⁻¹ de Agry-Gent®, 1.5 g L⁻¹ de Bemil®, 1.5 g L⁻¹ de Amistar®, 400 mg L⁻¹ ácido ascórbico, 150 mg L⁻¹ ácido cítrico y 30 gotas L⁻¹ de bactericida vegetal; después de esto, se realizaron 3 enjuagues con agua bidestilada, para posteriormente pasarse a la campana de flujo laminar.

3.9.3 Desinfección de los explantes

Este proceso se realizó en condiciones de asepsia bajo una campana de flujo laminar; se colocó el material vegetal en hipoclorito de sodio al 1.62% (30% v/v Cloralex®) por 15, 20, 25 o 30 min, a dichas disoluciones se les agregó 3 gotas de Tween-20 ® y 3 de bactericida vegetal por cada 100 mL de solución, después se le dio 3 enjuagues con agua bidestilada estéril por 1, 3 y 5 min

respectivamente y en agitación continua, y permanecieron en antioxidante hasta el momento de la siembra el cual contenía 150 mg L^{-1} de ácido ascórbico.

3.9.4 Siembra

Los cortes de los explantes se realizaron bajo la solución antioxidante; los explantes tipo nervadura central, se cortaba la nervadura y se les dejaba una porción de 1 mm de hoja a los costados en segmentos de 1.5 cm (Figura 2a), los tallos (Figura 4a y 4b), también fueron segmentos de 1.5 cm. Se establecieron en el medio Agua Agar suplementado con 500 mg L^{-1} de Bemil®, 500 mg L^{-1} de AgryGent®, 30.0 g L^{-1} de sacarosa, 4.0 g L^{-1} de Phytigel™ se ajustó el pH a 5.7 ± 0.02 usando 1N KOH o HCl, y se esterilizó por 20 min a 121°C y a 1.5 atm. Los frascos con medio de cultivo y explantes se mantuvieron en condiciones de completa oscuridad a $26^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ en una caja oscura tapada que no permitía el paso de luz.

3.9.5 Diseño experimental

En el octavo experimento se utilizó un diseño completamente al azar 2×4 , donde el factor A fueron los tipos de explante, tallo o nervadura central, el factor B fue el tiempo que permanecieron los explantes en hipoclorito de sodio al 1.62 % (30 % v/v Cloralex®) ya sea 15, 20, 25 o 30 min, teniendo un total de 8 tratamientos, con 5 repeticiones por cada uno con 5 explantes por unidad experimental. La forma de tomar los datos consistió en que se evaluó visualmente la porción del explante la cual presentaba la afectación, ya sea por oxidación o por contaminación fúngica o

bacteriana, se sumaba el porcentaje de cada explante por unidad experimental y es el valor que se le daba. Para realizar los análisis estadísticos fue necesario hacer la transformación de datos de porcentaje de oxidación y contaminación al $\text{ArcSeno}\sqrt{\frac{\%}{100}}$. La duración de este experimento fue de cinco semanas, después de esta fecha se eliminaron los frascos debido a los fuertes problemas de oxidación que se presentaron. Los análisis estadísticos se realizaron considerando como factores a las semanas, tipos de explantes y tratamientos con hipoclorito de sodio (cloro). Donde se realizó un análisis de varianza (SPSS 20.0) para ver si existió diferencia significativa, posterior a esto, se realizó una comparación de medias DMS (Paquete estadístico de la FAUANL. Olivares, 2013).

3.10 Noveno Experimento

Se utilizaron plántulas de tres meses de edad (Figura 1d, pag. 38), germinadas en bolsas plásticas llenas con una mezcla de peat moss y tierra negra las cuales permanecieron en el laboratorio desde el momento de la siembra.

3.10.1 Acondicionamiento previo *in vivo* de las plántulas

Con la finalidad de ayudar a erradicar la presencia de patógenos y altas tasas de oxidación en los explantes, las plántulas se establecieron y desarrollaron en condiciones homogéneas de fotoperíodo y temperatura, en un lugar cerrado; bajo estas condiciones, se asperjaron con una solución que contenía 4 g L⁻¹ de Agry-Gent®, 2 g L⁻¹ de Bemil® y 200 mg L⁻¹ de ácido ascórbico dos veces por

semana después de 40 días de la siembra y 3 días consecutivos antes de la colecta para el establecimiento.

3.10.2 Predesinfección de los explantes

La pre-desinfección utilizada consistió en seleccionar material vegetal en óptimas condiciones, folíolos completos sin daños aparentes, vigorosos, de buen porte y representativos del material criollo original. Todo el material vegetal colectado se lavó con jabón líquido y agua corriente. La solución de predesinfección del noveno establecimiento fue muy similar a la de los establecimientos siete y ocho, pero difirió en que la concentración de Bemil® fue de 2.0 g L^{-1} .

3.10.3 Desinfección de los explantes

Este proceso se realizó en condiciones de asepsia bajo una campana de flujo laminar; primero se sumergieron los explantes en alcohol al 20% (v/v) por 10 min, posteriormente se colocó el material vegetal en hipoclorito de sodio al 1.08% (20% v/v Cloralex®) por 10 min, a dicha disolución se les agregó 3 gotas de Tween 20 ® y 3 de bactericida vegetal por cada 100 mL de solución, después se realizaron 3 enjuagues con agua bidestilada estéril por 1, 3 y 5 min respectivamente y en agitación continua, y permanecieron en antioxidante hasta el momento de la siembra el cual contenía 600 mg L^{-1} de ácido ascórbico y 300 mg L^{-1} de ácido cítrico

3.10.4 Siembra

Los cortes de los explantes se realizaron bajo la solución antioxidante; los explantes tipo hoja se cortaron en láminas de 1.0 cm^2 (Figura 2b) los tipo nervadura central, se cortaba la nervadura y se les dejaba una porción de 1 mm de hoja a los costados en segmentos de 1.5 cm (Figura 2a) y los tallos (Figura 5), también eran segmentos de 1.5 cm. La siembra se realizó en los medios MS y WPM, suplementados con 2.0 mg L^{-1} BAP, 1.0 mg L^{-1} AIB y 1.0 mg L^{-1} Picloram, 4.0 g L^{-1} de phytigel, 30.0 g L^{-1} de azúcar, se ajustó el pH a 5.7, y se esterilizó por 20 min a 121°C y a 1.5 atm. Los frascos con medio de cultivo y explantes se mantuvieron en condiciones de completa oscuridad a $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ en una caja oscura tapada que no permitía el paso de luz.



Figura 5. Obtención de explantes de tallo; a) plántula de nogal criollo, b) cortes del tallo.

3.10.5 Diseño experimental

El modelo estadístico que se utilizó para el establecimiento del noveno experimento fue un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 2 x 3, donde el factor A fueron las sales de los medios de cultivo y el factor B el tipo de explantes, con diez repeticiones por tratamiento, teniendo un total de seis tratamientos donde cada repetición constaba de cinco explantes. La forma de tomar los datos consistió en que se evaluó visualmente la porción del explante la cual presentaba la afectación, ya sea por oxidación o por contaminación fúngica o bacteriana, se sumaba el porcentaje de cada explante por unidad experimental y es el valor que se le daba.

Para realizar los análisis estadísticos (análisis de varianza y DMS) fue necesario hacer la transformación de datos de porcentaje de oxidación y contaminación al $\text{ArcSeno}\sqrt{\%}$. Los análisis estadísticos se realizaron considerando como factores a: las semanas, tipos de explantes y medios de cultivo donde se establecieron. Se realizó un análisis de varianza (SPSS 20.0) para ver si existió diferencia significativa, posterior a esto, se realizó una comparación de medias DMS para ver si resultaron iguales o diferentes. Las primeras tres semanas se evaluaron datos como oxidación y contaminación; la variable que se evaluó en la cuarta semana fue el número de explantes con callo por unidad experimental; se realizó un análisis de varianza (SPSS 20.0) para ver si existió diferencia significativa, posterior a esto, se realizó una comparación de medias DMS (Paquete estadístico de la FAUANL. Olivares, 2013).

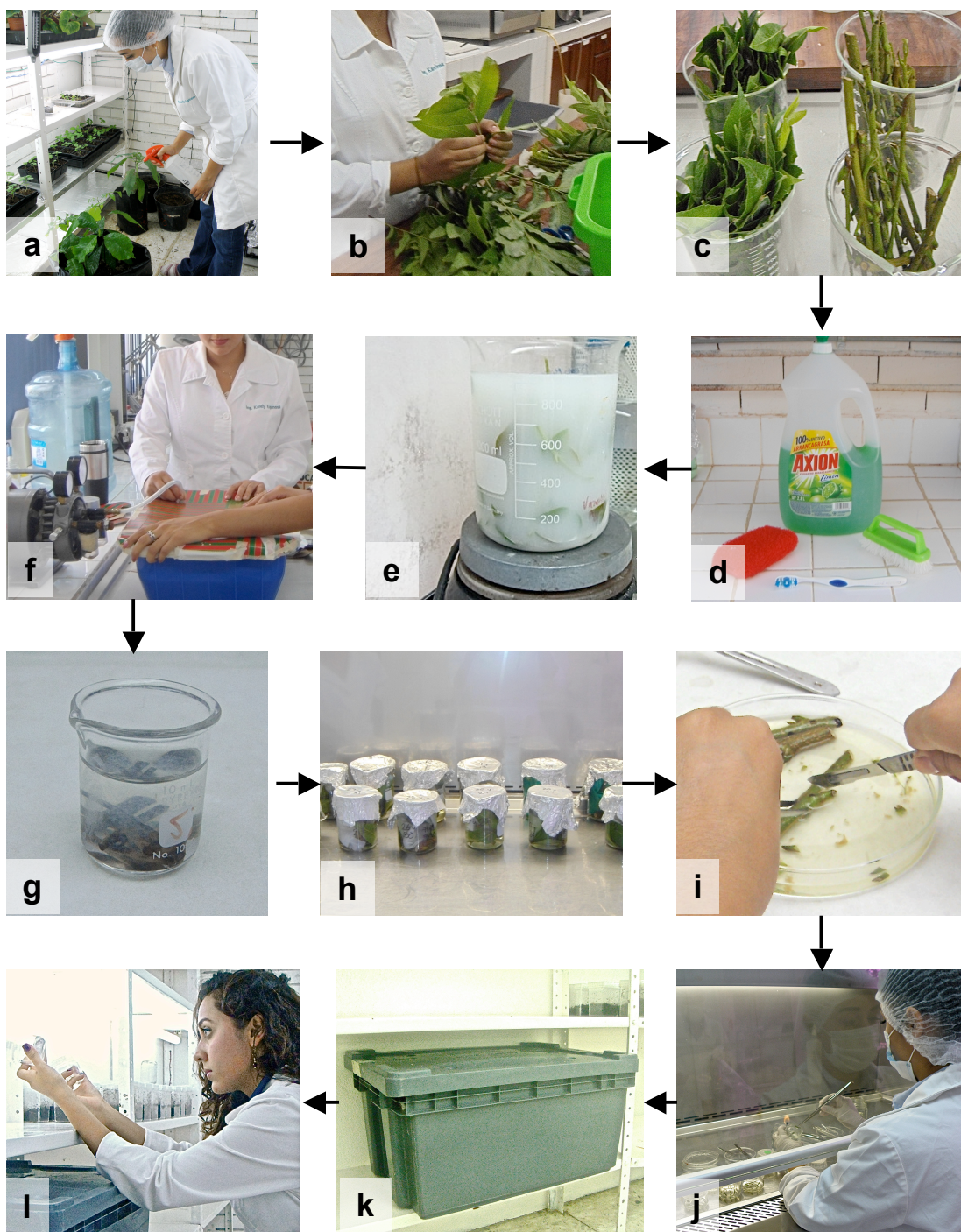


Figura 6. Pasos generales del establecimiento a) pretratamiento *in vivo*, b) selección del material vegetal, c) material vegetal seleccionado, d) material para el primer lavado con agua corriente y jabón, e) predesinfección con fungicidas y bactericidas en agitación, f) colocación de explantes con solución desinfectante al vacío, g) desinfección en campana, h) tratamiento con antioxidante, i) corte del explante, j) siembra del explante en medio de cultivo, k) incubación en obscuridad, l) observación de las unidades experimentales.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se desarrollaron 8 experimentos donde se utilizaron como explantes: yemas, hojas y raíces de árboles criollos de nogal (*Carya illinoensis* [Wangenh] K. Koch) en desarrollo, plántulas de campo de un mes de edad, plántulas obtenidas *in vitro* y plántulas mantenidas dentro del laboratorio, donde no se obtuvieron buenos resultados, presentándose altos niveles de contaminación y oxidación, y por consiguiente no hubo formación de callo. Las plántulas de nogal tratadas con químicos para desinfección, de tres meses, se destinaron para obtener explantes en un noveno experimento dónde después de tres semanas del establecimiento se logró observar respuesta, percibiéndose un ligero abultamiento en los explantes y a las cuatro semanas fue visible la existencia de callo. A continuación se describen los experimentos desarrollados para lograr los objetivos propuestos.

4.1 Primer Experimento

4.1.1 Porcentaje de oxidación

El análisis de varianza (Cuadro 3A) para la oxidación en hojas resultó con diferencias significativas para los factores semana y cloro en cuanto a los efectos principales. La

comparación de medias para semanas mostró que la oxidación se incrementó a medida que transcurría el tiempo.

Se realizó una prueba DMS (Cuadro 10) para detectar la significancia estadística de los promedios de porcentaje de oxidación por semana, se observó que todas son diferentes, y que conforme transcurren las semanas existió mayor oxidación en los explantes de tipo hoja.

Cuadro 10. Comparación de medias de porcentaje de oxidación por semana en el primer experimento con los explantes de tipo hoja.

Semana	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
5	90.00	100.000	a
4	84.75	95.278	b
3	75.50	86.667	c
2	64.63	74.167	d
1	50.13	54.722	e

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística
DMS= 4.1666

La comparación de medias para los niveles de cloro (Cuadro 11) mostró que en los tratamientos 1, 2 y 4 hay menos oxidación en los explantes y el que presentó el mayor promedio de esta variable fue el tratamiento 6, coincidiendo con que los explantes menos afectados tienen los valores y tiempos más bajos de exposición a hipoclorito de sodio, esto pudiera explicarse ya que dicha sustancia es un compuesto activo frente a bacterias, virus, hongos y esporas bacterianas que en concentraciones adecuadas puede emplearse como un desinfectante químico, sin embargo, la aplicación práctica de sus propiedades se contrapone por la acción

oxidante que esta solución exhibe y que provoca daño en las superficies sobre las que actúa (Beena *et al.*, 2003).

Cuadro 11. Comparación de medias para porcentaje de oxidación por tiempo de exposición y concentración de hipoclorito de sodio en el primer experimento con los explantes de tipo hoja.

No. de tratamiento	Tratamiento	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
6	1.08 % NaClO – 10 min	95.000	84.3	a
5	1.08 % NaClO – 5 min	84.000	75.6	b
3	0.81 % NaClO – 5 min	81.000	72.0	bc
4	0.81 % NaClO – 10 min	79.666	71.2	bcd
2	0.54 % NaClO – 10 min	77.666	68.1	cd
1	0.54 % NaClO – 5 min	75.667	66.8	d

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística
DMS= 4.1666

4.1.2 Porcentaje de contaminación bacteriana

El análisis de varianza (Cuadro 4A) para la contaminación bacteriana en hojas resultó con diferencia significativa para el factor antioxidante en cuanto a los efectos principales. La comparación de medias del porcentaje de contaminación para los tiempos de permanencia en el antioxidante (Cuadro 12) mostró que hubo mayor contaminación en el tratamiento donde los explantes permanecieron 24 h.

4.1.3 Porcentaje de contaminación fúngica

El análisis de varianza (Cuadro 5A) para el porcentaje de contaminación fúngica en hojas resultó con diferencia significativa para semana, cloro y antioxidante en cuanto

a los efectos principales. La comparación de medias de semanas evidenció que conforme transcurría el tiempo la contaminación iba en aumento, observándose el cambio más significativo cuando se pasó de la segunda a la tercera semana del experimento (Cuadro 13).

Cuadro 12. Comparación de medias de porcentaje de contaminación bacteriana por efecto de permanencia en el antioxidante en el primer experimento con los explantes de tipo hoja.

	Tiempo en antioxidante	Media	%	Sig=0.05*
1-	24 h	2.2	2.4	a
2 –	30 min	0.0	0.0	b

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.

DMS= 2.01

Cuadro 13. Comparación de medias de porcentaje de contaminación fúngica por semana en el primer experimento con los explantes de tipo hoja.

Semana	Media ajustada	Media	Sig=0.05*
5	23.029	24.2	a
4	18.832	19.0	ab
3	11.809	11.3	bc
2	4.771	3.8	cd
1	2.298	1.6	d

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.

DMS= 7.33

También se realizó una comparación de medias del desinfectante (hipoclorito de sodio) (Cuadro 14), en donde se encontró que a menor concentración y tiempo en la solución se presentaron tasas de porcentaje de contaminación más altas, a excepción del tratamiento 3, el cual presentó la tasa más baja de contaminación

fúngica, sin embargo, si se observa la tabla de resultados, se puede apreciar que a pesar de mostrar pocas unidades experimentales con este tipo de infección, también presentó inoculación bacteriana, y al momento de fusionar los dos tipos de contaminación, el resultado fue muy similar que el encontrado en los primeros dos tratamientos.

Cuadro 14. Comparación de medias de porcentaje de contaminación fúngica por nivel de hipoclorito de sodio en el primer experimento con los explantes de tipo hoja.

No. de tratamiento	Hipoclorito de sodio	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
1	0.54 % NaClO – 5 min	21.2	21.1	a
2	0.54 % NaClO – 10 min	20.1	17.3	a
4	0.81 % NaClO – 10 min	11.0	2.2	b
5	1.08 % NaClO – 5 min	10.4	9.5	b
6	1.08 % NaClO – 10 min	8.7	12.9	bc
3	0.81 % NaClO – 5 min	1.5	8.6	d

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.

DMS=8.032

Igualmente se elaboró una comparación de medias para estudiar el efecto del antioxidante (Cuadro 15), en donde se obtuvo que en el tratamiento donde permanecieron menor tiempo los explantes en la solución existió mayor contaminación, dicho resultado coincide con los resultados de contaminación por bacterias.

Alcón *et al.* (2009) realizaron un trabajo sobre mejora genética del nogal (*Juglans regia* L.) para la producción de madera de calidad, en donde indicaron que utilizar yemas apicales de árboles adultos no fue una alternativa viable debido a que el

100 % de los explantes se perdieron debido a la contaminación externa, interna o por exudaciones. Además, utilizaron segmentos internodales con una yema como explantes de árboles de dos años donde éstas eran tiernas y el aspecto el que caracteriza a un material muy sano; a pesar de esto, apareció nuevamente contaminación. Los daños que esta contaminación endógena produjo en los tejidos de la yema impidieron que ésta tenga reactividad. Los resultados obtenidos por estos autores fueron muy similares a los obtenidos en esta investigación, donde la contaminación y oxidación de los explantes limitaron el establecimiento de la especie en su primera fase.

Cuadro 15. Comparación de medias de porcentaje de contaminación fúngica por tiempo de exposición al antioxidante en el primer experimento con los explantes de tipo hoja.

Antioxidante		Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
2 -	30 min	16.03	17.80	a
1-	24 h	8.30	9.06	b

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.

4.2 Segundo Experimento

4.2.1 Porcentaje de oxidación

Para el explante tipo hoja se evaluaron cuatro medios utilizando una dosis de desinfección de hipoclorito de sodio (0.54 NaClO % - 5 min) y un antioxidante (30 min) durante un periodo de dos semanas en donde se encontró un porcentaje de

oxidación total desde la primera semana para todas las unidades experimentales, a excepción de dos de ellas, las cuales tuvieron una oxidación del 75%, sin embargo para la segunda semana, el 100% de las unidades experimentales estaba 100% oxidado.

El ANOVA (Cuadro 6A) para el porcentaje de oxidación en yemas resultó con diferencias significativas para semana en cuanto a los efectos principales. Se realizó una prueba DMS (Cuadro 16) para detectar la significancia estadística de los promedios de porcentaje de oxidación por semana, se observó que todas son diferentes, y que conforme transcurren las semanas existió mayor porcentaje de oxidación en los explantes de tipo yema.

Cuadro 16. Comparación de medias de porcentaje de oxidación por semana en el segundo experimento con los explantes de tipo yema.

Semana	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
4	87.8	98.8	a
3	67.8	76.8	b
2	31.2	27.8	c
1	23.3	15.8	d

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.

DMS= 4.358

4.2.2 Porcentaje de contaminación bacteriana

En cuanto a los explantes de tipo hoja, al analizar el contenido de bacterias en las dos semanas no se encontraron daños por estos microorganismos, por tal motivo no

se realizó el análisis de varianza para el porcentaje de contaminación bacteriana en hojas.

El ANOVA (Cuadro 7A) para el porcentaje de contaminación bacteriana en yemas resultó con diferencia significativa para semana en cuanto a los efectos principales. En la comparación de medias de semana (Cuadro 17) se observó que todas fueron diferentes, y que conforme transcurrieron las semanas existió mayor porcentaje de contaminación en los explantes de tipo yema.

4.2.3 Porcentaje de contaminación fúngica

Al analizar el contenido de hongos en hojas a las dos semanas después de su escisión no se encontraron daños significativos por estos microorganismos a excepción de tres unidades experimentales, de las cuales dos unidades experimentales tuvieron un porcentaje de contaminación del 25% en la primera semana, creciendo a 100% en la segunda semana, y la tercera unidad experimental presentó contaminación del 50% en la primera y segunda semana.

El ANOVA (Cuadro 8A.) para el porcentaje de contaminación fúngica en yemas resultó con diferencia significativa para el factor desinfección. La comparación de medias (Cuadro 18) de desinfección con hipoclorito de sodio evidenció que para la dosis más baja y menor tiempo de exposición, se presentó el mayor porcentaje de contaminación por el agente fúngico, circunstancia evidente al ser el tratamiento en el cual el material vegetal estuvo menos expuesto a la acción del desinfectante, y

para el resto de las concentraciones de la solución, la presencia de contaminación fue similar a excepción del tercer nivel, el cual no mostró este tipo de contaminante; dicho resultado coincide con lo previamente citado por Alcón *et al.* (2009).

Cuadro 17. Comparación de medias de porcentaje de contaminación bacteriana por semana en el segundo experimento con los explantes de tipo yema.

Semana	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
4	83.4	93.8	a
3	78.7	88.3	b
2	68.9	75.0	c
1	38.6	39.4	d

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.

DMS= 3.7

4.3 Tercer Experimento

4.3.1 Porcentaje de oxidación

El ANOVA (Cuadro 9A) para la oxidación en hojas y yemas resultó con diferencias significativas para los efectos principales: semana, explante (hoja y yema) y antioxidante (30 min o 24 h).

La comparación de medias (Cuadro 19) para los porcentajes de oxidación por semana mostraron diferencia en las dos semanas, conforme transcurrió el tiempo la oxidación fue en aumento, evidenciando desde la primer semana que existió una tasa muy alta de esta afección.

Cuadro 18. Comparación de medias de porcentaje de contaminación fúngica dependiente del efecto por desinfección en el segundo experimento con los explantes de tipo yema.

No. de tratamiento	Tratamiento	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
1	0.54 % NaClO – 5 min	8.57	8.93	a
2	0.54 % NaClO – 10 min	1.61	1.79	ab
4	0.81 % NaClO – 10 min	1.07	0.89	b
3	0.81 % NaClO – 5 min	0.00	0.00	b

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.

DMS= 7.282

Cuadro 19. Comparación de medias del porcentaje de oxidación por semana en el tercer experimento con los explantes de tipo hoja y yema.

Semana	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
2	64.88	75.38	a
1	51.92	60.19	b

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.

DMS= 4.1666

Igualmente se realizó una prueba DMS (Cuadro 20) para detectar la significancia estadística de los promedios de porcentaje de oxidación dependiendo de los tipos de explante (hojas y yemas), en donde se observó que los explantes de tipo yema se oxidaron más que los de tipo hoja. Por lo general, cuando se desarrolla este tipo de trabajos, se realizan pruebas con diferentes tipos de explantes para observar cual es el más apto, el que se contamina menos, se oxida menos, prolifera, entre otras. Por ejemplo, la regeneración en *Syzygium cuminii* se vio limitada por la alta oxidación ocurrida en los brotes apicales y segmentos nodales utilizados como explantes (Yadav *et al.*, 1990), para evitar el problema, debieron utilizar como explante plántulas provenientes de semillas germinadas en condiciones asépticas.

Cuadro 20. Comparación de medias de porcentaje de oxidación en explantes del tercer experimento.

Explante	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
Yema	70.57	85.11	a
Hoja	46.22	50.45	b

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.

DMS= 4.194

También se realizó una prueba DMS (Cuadro 21) para detectar la significancia estadística de los promedios de porcentaje de oxidación dependiente del tiempo de inmersión en antioxidante (30 min o 24 h), se observó que los explantes que permanecieron mayor tiempo en la solución antioxidante se oxidaron más después del establecimiento en el medio, lo cual puede ser explicado ya que el antioxidante no permite que los explantes liberen las sustancias fenólicas que contienen mientras están en dicha solución, y cuando estos explantes pasan al medio de cultivo los liberan (*).

Cuadro 21. Comparación de medias del porcentaje de oxidación por tiempo de inmersión en el antioxidante en el tercer experimento.

Antioxidante	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
24 h	66.20	77.38	a
30 min	50.61	58.18	b

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística

DMS= 4.194

(*) Comunicación personal con Dra. Darcy Ríos Leal, Directora del Programa de Postgrado en la Universidad de Concepción en Chile, diciembre de 2013.

4.3.2 Porcentaje de contaminación bacteriana

El análisis de varianza (Cuadro 10A) para el porcentaje de contaminación bacteriana resultó con diferencia altamente significativa para los factores semana y tipo de explante (hojas y yemas). La comparación de medias para semana (Cuadro 22) mostró que conforme pasaba el tiempo el porcentaje de contaminación fue en aumento.

Cuadro 22. Comparación de medias del porcentaje de contaminación bacteriana por semana en el tercer experimento.

Semana	Media ajustada	Media	Sig=0.05*
2	18.31	19.46	a
1	7.67	7.46	b

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.

DMS= 5.154

La comparación de medias de tipos de explante (Cuadro 23) mostró que fue mayor el porcentaje de contaminación en las yemas; este resultado se puede explicar por el hecho de que los explantes de tipo yema presentaban corteza y en esta parte se concentra mayor cantidad de microorganismos, es un poco más difícil de erradicarlos por la naturaleza de la superficie de la corteza, además comúnmente este tipo de material es más viejo y por lo tanto más susceptible a que contenga contaminación endógena.

Cuadro 23. Comparación de medias del porcentaje de contaminación bacteriana por explante en el tercer experimento.

Explante	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
Yema	16.96	17.58	a
Hoja	9.02	9.53	b

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística
DMS= 5.154

4.3.3 Porcentaje de contaminación fúngica

El análisis de varianza (Cuadro 11A) para la contaminación fúngica resultó con diferencia altamente significativa para los factores semana y antioxidante. La comparación de medias, para semanas evidenció que conforme pasaban las semanas el porcentaje de contaminación fue aumentando (Cuadro 24).

Igualmente se elaboró una comparación de medias para los tiempos de permanencia del explante en antioxidante (Cuadro 25), en donde se obtuvo que en el tratamiento donde permanecieron menor tiempo los explantes en la solución existió menor contaminación, lo cual se puede explicar ya que al estar los explantes mayor tiempo en condiciones húmedas, la probabilidad de contaminación aumenta.

Cuadro 24. Comparación de medias del porcentaje de contaminación fúngica por semana en el tercer experimento.

Semana	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
2	17.85	19.92	a
1	7.45	6.40	b

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.
DMS= 5.846

Cuadro 25. Comparación de medias del porcentaje de contaminación fúngica por mayor tiempo de exposición al antioxidante en el tercer experimento.

Antioxidante	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
24 h	17.58	18.87	a
30 min	7.72	7.46	b

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.

DMS= 5.846

4.4 Cuarto Experimento

4.4.1 Porcentaje de oxidación

El ANOVA (Cuadro 12A) para el porcentaje oxidación resultó con diferencia significativa para los factores semana y explante. La comparación de medias para semanas, evidenció que conforme pasaba el tiempo el porcentaje de oxidación iba en aumento, se observó que en una semana el aumento del tejido oxidado fue del doble (Cuadro 26).

En la prueba de comparación de medias (Cuadro 27), de explantes se encontró que las hojas se oxidaron mas que las yemas, esto pudo deberse a que los tratamientos de predesinfección fueron muy fuertes dañándose las hojas, y siendo éstas más sensibles a la acción del agente desinfectante que funcionó como oxidante (hipoclorito de sodio) las yemas resistieron un poco más a la oxidación.

Cuadro 26. Comparación de medias del porcentaje de oxidación por semana en el cuarto experimento.

semana	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
2	65.35	73.96	a
1	33.67	33.17	b

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.

DMS= 3.405

Cuadro 27. Comparación de medias del porcentaje de oxidación por explante en el cuarto experimento.

Explante	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
Hoja	56.52	44.3	a
Yema	42.49	26.5	b

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.

DMS= 3.405

4.4.2 Porcentaje de contaminación bacteriana

El ANOVA (Cuadro 13A) para el porcentaje de contaminación bacteriana resultó con diferencia significativa para los factores explante (hoja o yema), pretratamiento (Cuadro 7), tiempo en pretratamiento (24 h o 30 min) y alcohol (si se sometieron los explantes o no a desinfección). La comparación de medias (Cuadro 28) de explantes evidenció que las yemas se contaminaron más que las hojas, ya que estas presentan una porción de corteza en donde es un poco más complicado de erradicar los contaminantes por las hendiduras naturales del tallo, además este tipo de material es más viejo y por lo tanto más susceptible a que contenga contaminación endógena.

Cuadro 28. Comparación de medias del porcentaje de contaminación bacteriana por explante en el cuarto experimento.

Explante	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
Yema	40.1	44.3	a
Hoja	24.8	26.5	b

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.

DMS= 6.894

La comparación de medias (Cuadro 29) de los pretratamientos con las productos fungicidas y bactericidas, mostró que la cuarta y tercera solución (Cuadro 7) fueron iguales y con tasas altas de contaminación bacteriana, caso completamente contrario a los pretratamientos uno y dos, los cuales también resultaron iguales. A pesar de que en las soluciones el único bactericida utilizado fue el Biomycin ® y para todas se usó la misma proporción, la principal diferencia entre los primeros dos tratamientos y los dos últimos es que en los primeros se usó Cuperhidro ® (fungicida), lo que se puede interpretar es que se hizo buena sinergia entre estos productos lo cual ayudó a bajar los índices de porcentaje de contaminación por bacterias.

La comparación de medias (Cuadro 30) de los pretratamientos, mostró que cuando el material vegetal permaneció 24 h en la solución, se observó mayor incidencia de contaminación por bacterias, la explicación a esto puede ser que cuando el material vegetal permanece mucho tiempo en condiciones húmedas, los contaminantes se pueden dispersar más rápido y causar daño.

Cuadro 29. Comparación de medias del porcentaje de contaminación bacteriana dependiendo del pretratamiento en el cuarto experimento.

Pretratamiento*	Media ajustada	Media	Sig=0.05 **
4	40.81	43.91	a
3	36.04	40.63	a
2	26.04	28.91	b
1	26.42	28.20	b

*Las soluciones de los pretratamientos se especifican en el Cuadro 7

**Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.

DMS= 7.96

Cuadro 30. Comparación de medias del porcentaje de contaminación bacteriana dependiente del tiempo en pretratamiento en el cuarto experimento.

Tiempo en pretratamiento	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
24 h	43.25	47.46	a
30 min	21.65	23.36	b

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.

DMS= 6.894

La comparación de medias (Cuadro 31) para los niveles del factor alcohol mostró una menor contaminación por bacteria en el tratamiento con la presencia de alcohol sin embargo los porcentajes no tuvieron una diferencia importante.

4.4.3 Porcentaje de contaminación fúngica

El ANOVA (Cuadro 14A) para la contaminación fúngica resultó con diferencia significativa para los factores semana, tipos de explante (hoja o yema), alcohol (si se sometieron los explantes o no a la desinfección con alcohol) y cloro (0.81% NaClO por 5 min o 0.54% NaClO por 10 min). La comparación de medias (Cuadro 32) de

semanas evidenció que la contaminación fúngica creció conforme transcurrió el tiempo, ya que una vez presentándose el microorganismo, este sigue creciendo.

Cuadro 31. Comparación de medias del porcentaje de contaminación bacteriana dependiente de la desinfección con alcohol en el cuarto experimento.

Alcohol	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
No	36.54	39.81	a
Si	28.36	31.02	b

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.
DMS= 6.894

Cuadro 32. Comparación de medias del porcentaje de contaminación fúngica dependiente del efecto: semana en el cuarto experimento.

semana	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
2	4.063	4.30	a
1	0.948	0.90	b

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.
DMS= 2.569

El análisis DMS(Cuadro 33) para explante presentó que las yemas tuvieron mayor problema por contaminación fúngica en comparación con las hojas, considerando este hecho, es evidente que los explantes de tipo yema presentaban una porción de corteza y en esta parte se concentra mayor cantidad de microorganismos, en cambio en hojas, la superficie es más lisa y dichos contaminantes superficiales se eliminaron más fácilmente.

Cuadro 33. Comparación de medias del porcentaje de contaminación fúngica dependiente del tipo de explante en el cuarto experimento.

Explante	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
Yema	4.406	4.80	a
Hoja	0.605	0.39	b

DMS= 2.569

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.

La comparación de medias (Cuadro 34) para el efecto desinfectante del alcohol, mostró una mayor contaminación fúngica en el caso en donde el alcohol estuvo presente.

Cuadro 34. Comparación de medias del porcentaje de contaminación fúngica dependiente de la desinfección con alcohol en el cuarto experimento.

Alcohol	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
Sí	5.01	5.19	a
No	0.00	0.00	b

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.

DMS= 2.569

Igualmente se realizó la prueba DMS para el hipoclorito de sodio, en donde se encontró que a menor tiempo de exposición en dicha solución, los explantes se contaminaron más, aunque la concentración fuera mayor en el tratamiento con el menor tiempo.

Cuadro 35. Comparación de medias del porcentaje de contaminación fúngica dependiente de la desinfección con hipoclorito de sodio en el cuarto experimento.

Hipoclorito de sodio	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
0.81% NaClO – 5 min	4.66	4.80	a
0.54% NaClO – 10 min	0.35	0.39	b

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.

DMS= 2.569

4.5 Quinto Experimento

4.5.1 Porcentaje de oxidación

El análisis de varianza (Cuadro 15A) para porcentaje de oxidación resultó con diferencia altamente significativa para los factores semana, explante (nervadura, tallo y raíz), y cloro (10% NaClO por 15 o 10 min). La comparación de medias (Cuadro 36) para semanas, indicó que en la segunda semana se mostró un mayor porcentaje de oxidación que en la primera.

Cuadro 36. Comparación de medias del porcentaje de oxidación por semana en el quinto experimento.

semana	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
2	46.99	53.30	a
1	14.43	6.66	b

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.

DMS= 1.782

También se realizó la prueba DMS (Cuadro 37) para el factor explante, presentando que los explantes tipo nervadura mostraron mayor porcentaje de oxidación que tallo y raíz, siendo este ultimo el que mostró los valores más bajos en cuanto a este efecto.

Cuadro 37. Comparación de medias del porcentaje de oxidación dependiente del tipo de explante en el quinto experimento.

Explante	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
3 Nervadura	33.5	35.13	a
1 Tallo	29.9	27.83	b
2 Raíz	28.7	27.00	b

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.
DMS= 2.183

La prueba DMS (Cuadro 38) para el efecto cloro indicó que los explantes con mayor porcentaje de oxidación fueron aquellos que permanecieron más tiempo en la solución con hipoclorito de sodio.

Cuadro 38. Comparación de medias del porcentaje de oxidación dependiente de la desinfección con cloro en el quinto experimento.

Cloro	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
10% NaClO – 15 min	32.5	32.92	a
10% NaClO – 10 min	28.9	27.05	b

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.
DMS= 1.782

4.5.2 Porcentaje de contaminación bacteriana

En el ANOVA (Cuadro 16A) para el porcentaje de contaminación bacteriana se encontró diferencias altamente significativos en los niveles de los factores semana,

explante (raíz, tallo y nervadura) y medio de cultivo (MS o WPM). A partir de este análisis se realizó una prueba DMS (Cuadro 39) para el efecto semana, presentando en los resultados que para la segunda semana el porcentaje de contaminación bacteriana fue superior.

Cuadro 39. Comparación de medias del porcentaje de contaminación bacteriana para el efecto de semana en el quinto experimento.

semana	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
2	37.3	39.08	a
1	14.7	15.00	b

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.
DMS= 9.188

De acuerdo a los resultados de la prueba DMS (Cuadro 40) para el efecto de explante, se observó que tallo y raíz resultaron iguales con los mayores porcentajes de contaminación, esto debido a que en el suelo se encuentra mayor cantidad de microorganismos y la raíz está en contacto directo con éste, en el caso del tallo es debido a la cercanía con el suelo.

Cuadro 40. Comparación de medias del porcentaje de contaminación bacteriana dependiente del tipo de explante en el quinto experimento.

	Explante	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
2	Raíz	33.4	26.5	a
1	Tallo	28.9	31.0	a
3	Nervadura	15.7	13.6	b

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.
DMS= 11.253

La prueba DMS (Cuadro 41) para el efecto de medio de cultivo indicó que los explantes se contaminaron más cuando se establecieron en el medio WPM que en el MS.

Cuadro 41. Comparación de medias del porcentaje de contaminación bacteriana por efecto del medio de cultivo en el quinto experimento.

Medio	Media ajustada	Media	Sig=0.05*
WPM	37.6	40.1	a
MS	14.4	14.0	b

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.
DMS= 9.188

4.5.3 Porcentaje de contaminación fúngica

Se realizó un ANOVA (Cuadro 17A) para el porcentaje de contaminación fúngica, resultando altamente significativo los factores semana y explante (raíz, tallo y nervadura). A partir de este análisis se realizó una prueba DMS (Cuadro 42) para el factor semana, encontrando que para la segunda semana el porcentaje de contaminación fue mayor.

Cuadro 42. Comparación de medias del porcentaje de contaminación fúngica por semana en el quinto experimento.

semana	Media ajustada	Media	Sig=0.05*
2	15.506	12.25	a
1	0.00	0.00	b

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.
DMS= 3.795

La comparación de medias (Cuadro 43) para el efecto explante mostró los más altos porcentajes de contaminación en los explantes de raíz, seguido por nervadura y finalmente tallo; la raíz al desarrollarse en el suelo, contiene una gran cantidad de microorganismos resultando más complicado erradicarlos de esta zona.

Cuadro 43. Comparación de medias del porcentaje de contaminación fúngica por efecto del explante en el quinto experimento.

	Explante	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
2	Raíz	11.1	9.4	a
3	Nervadura	8.3	6.0	ab
1	Tallo	3.9	3.0	b

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.

DMS= 4.608

La desinfección de explantes aislados de plantas leñosas perennes ha sido siempre una de las limitantes más severas para el establecimiento in vitro de este tipo de especies reportándose contaminaciones mayores del 90% en explantes de roble (Suárez *et al.*, 2006), guayaba dulce [*Psidium guajaba* (Mirtaceae)] (Viloria *et al.*, 1993), caoba y cedro (Abdelnour y Muñoz, 1997).

4.6 Sexto Experimento

4.6.1 Porcentaje de oxidación

El ANOVA (Cuadro 18A) para oxidación resultó con diferencias significativas para semana y explante en cuanto a los efectos principales. A partir de este análisis se

realizó una prueba DMS (Cuadro 44) para semana, presentando en los resultados que para la segunda semana la contaminación fue mayor.

Cuadro 44. Comparación de medias del porcentaje de oxidación por semana en el sexto experimento.

semana	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
2	67.4	82.5	a
1	38.9	40.2	b

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.

DMS= 5.667

La comparación de medias (Cuadro 45) para explante, mostró una mayor oxidación en nervadura, dicho resultado coincide con el experimento anterior, donde los valores más altos los tuvo este tipo de explante.

Cuadro 45. Comparación de medias del porcentaje de oxidación para el efecto del explante en el sexto experimento.

	Explante	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
3	Nervadura	60.2	72.0	a
2	Raíz	51.2	58.5	b
1	Tallo	48.1	53.0	b

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.

DMS= 6.936

4.6.2 Porcentaje de contaminación bacteriana

Se realizó un ANOVA (Cuadro 19A) para el porcentaje de contaminación bacteriana, obteniendo como resultados alta significancia estadística para semana en cuanto a los efectos principales. A partir de este análisis se realizó una prueba DMS (Cuadro

46), presentando en los resultados que para la segunda semana la contaminación fue mayor.

Cuadro 46. Comparación de medias del porcentaje de contaminación bacteriana para el efecto semana en el sexto experimento.

semana	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
2	30.6	32.3	a
1	16.4	12.7	b

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.
DMS= 10.481

4.6.3 Porcentaje de contaminación fúngica

Se realizó un ANOVA (Cuadro 20A) para el porcentaje de contaminación fúngica, obteniendo alta significancia estadística para el efecto semana. A partir de este análisis se realizó una prueba DMS (Cuadro 47), mostrando en los resultados que para la segunda semana el porcentaje de contaminación fue mayor.

Cuadro 47. Comparación de medias del porcentaje de contaminación fúngica para el efecto semana en el sexto experimento.

semana	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
2	43.3	51.0	a
1	20.6	16.0	b

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.
DMS= 1.782

La alta contaminación por hongos y bacterias en los explantes, generada por la procedencia de las plantas directamente del campo, ya sea de árboles de dos años de edad o de plántulas de un mes, no permitió el establecimiento de la especie debido, esta no es una alternativa viable por que el 100% de los explantes se perdieron debido a la contaminación externa, interna y/o por exudaciones, esto sucedió para los primeros seis experimentos.

4.7 Séptimo Experimento

4.7.1 Porcentaje de oxidación

En el ANOVA (Cuadro 21A) para el porcentaje de oxidación resultaron con diferencias significativas los factores semana y explante (tallo y nervadura). A partir de este análisis se realizó una prueba DMS (Cuadro 48) para el efecto semana, encontrando en los resultados que a medida que transcurría el tiempo el porcentaje de oxidación se incrementó, obteniendo desde la primer semana porcentajes muy altos, de casi un 60 %, todas las semanas fueron diferentes a excepción de la cuarta y quinta que fueron iguales, donde los valores para la cuarta semana fueron casi de un 100 %

La comparación de medias (Cuadro 49) entre los explantes mostró una mayor oxidación en el de tipo tallo, aunque la diferencia no fue importante respecto a la oxidación en el explante tipo nervadura.

Cuadro 48. Comparación de medias del porcentaje de oxidación para el efecto de semana en el séptimo experimento.

semana	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
5	90.00	100.00	a
4	88.66	99.63	a
3	80.27	95.40	b
2	69.38	85.38	c
1	50.35	58.88	d

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.
DMS= 2.998

Cuadro 49. Comparación de medias del porcentaje de oxidación por explante en el séptimo experimento.

Explante	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
1 Tallo	76.73	89.23	a
2 Nervadura	74.74	86.48	b

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.
DMS= 1.896

4.7.2 Porcentaje de contaminación bacteriana

El ANOVA (Cuadro 22A) para esta variable no mostró diferencias significativas en ninguno de los efectos principales ni las interacciones

4.7.3 Porcentaje de contaminación fúngica

El ANOVA (Cuadro 23A) para el porcentaje de contaminación fúngica siguió la misma tendencia que en contaminación por bacterias al no encontrar diferencia significativa en ninguno de los efectos.

4.8 Octavo Experimento

4.8.1 Porcentaje de oxidación

El análisis estadístico (Cuadro 24A) para el porcentaje de oxidación, mostró diferencias significativas entre los niveles de semana y significativo para los niveles de cloro (1.62 % NaClO por 15, 20, 25 o 30 min). A partir de este análisis se realizó una prueba DMS (Cuadro 50) para el factor semana, en donde se observó que todas las semanas fueron diferentes a excepción de los porcentajes de oxidación obtenidos en la cuarta y quinta semana, resaltando que en la cuarta semana los valores para esta variable eran de casi un 100%; además se apreció que desde la primera semana los valores eran muy altos, casi de un 60%.

Cuadro 50. Comparación de medias del porcentaje de oxidación para el efecto de semana en el octavo experimento.

semana	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
5	90.00	100.00	a
4	88.86	99.68	a
3	80.03	94.95	b
2	71.04	86.83	c
1	50.20	58.63	d

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.
DMS= 3.204

Los resultados de la prueba DMS (Cuadro 51) para los niveles de hipoclorito de sodio mostraron un menor daño cuando el explante estuvo menor tiempo inmerso esto debido a que el hipoclorito daña la superficie sobre la que actúa (Beena *et al.*, 2003),

sin embargo aún en el tratamiento con el menor tiempo los daños fueron importantes llegando hasta un 86%.

4.8.2 Porcentaje de contaminación bacteriana

Para este experimento no se observó contaminación por bacteria, debido a esto no fue necesario realizar un ANOVA.

Cuadro 51. Comparación de medias del porcentaje de oxidación dependiente del efecto de desinfección con cloro en el octavo experimento.

No. de tratamiento	Cloro	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
4	1.62 % NaClO – 30 min	77.74	89.38	a
3	1.62 % NaClO – 25 min	77.27	89.78	a
2	1.62 % NaClO – 20 min	75.02	86.88	ab
1	1.62 % NaClO – 15 min	74.04	86.02	b

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.
DMS= 2.866

4.8.3 Porcentaje de contaminación fúngica

El ANOVA (Cuadro 25A) para el porcentaje de contaminación fúngica, resultó con diferencias altamente significativo para el efecto de explante (tallo y nervadura) en cuanto a los efectos principales. El resultado de la prueba DMS (Cuadro 52) mostró que hubo diferencias entre los diferentes tipos de explante, encontrándose que el tallo fue el que más se contaminó.

Cuadro 52. Comparación de medias del porcentaje de contaminación fúngica por efecto de tipo de explante en el octavo experimento.

Explante	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
1 Tallo	7.64	8.10	a
2 Nervadura	0.00	0.00	b

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.
DMS= 4.84

4.2 Noveno Experimento

4.9.1 Porcentaje de oxidación

El ANOVA (Cuadro 26A) para el porcentaje de oxidación, resultó con diferencias altamente significativas para semana y significativas para el factor medio de cultivo (MS y WPM). El resultado de la prueba DMS (Cuadro 53) mostró que el porcentaje de oxidación se incrementó a medida que transcurrió el tiempo.

Cuadro 53. Comparación de medias del porcentaje de oxidación para el efecto de semana en el noveno experimento.

semana	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
3	23.88	16.67	a
2	21.54	13.75	b
1	14.83	6.81	c

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.
DMS= 1.134

La prueba DMS (Cuadro 54) para los medios de cultivo indicó diferencia significativa con una mayor oxidación en el medio WPM, aunque la diferencia en los porcentajes de oxidación entre los dos medios no fue importante desde un punto de vista práctico.

Cuadro 54. Comparación de medias del porcentaje de oxidación para el efecto de medio de cultivo en el noveno experimento.

Medio	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
WPM	20.60	13.00	a
MS	19.56	11.81	b

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.
DMS= 1.846

4.9.2 Porcentaje de contaminación bacteriana

Para este experimento, la técnica de desinfección ya se había perfeccionado al punto de que se logró erradicar la contaminación por bacteria, y debido a esto no fue necesario realizar un ANOVA.

4.9.3 Porcentaje de contaminación fúngica

El ANOVA (Cuadro 27A) para el porcentaje de contaminación fúngica resultó con diferencias significativas para las semanas. El resultado de la prueba DMS (Cuadro 55) mostró diferencia estadística, además de que los explantes presentaron mayor incidencia por hongos conforme el tiempo transcurrió.

Cuadro 55. Comparación de medias del porcentaje de contaminación fúngica para el efecto de semana en el noveno experimento.

semana	Media ajustada	Media	Sig=0.05 *
3	8.44	7.99	a
2	4.32	3.14	b
1	0.18	0.07	c

*Medias con la misma letra, tienen igualdad estadística.

DMS= 3.523

4.9.4 Porcentaje de formación de callo

Para la formación de callo se observó que los explantes respondieron primero en el medio MS comparado con los explantes establecidos en el medio WPM (Figura 7). Para la cuarta semana, el 80 % de los explantes que se establecieron en el medio MS presentaban callo, y para el medio WPM el resultado fue del 66.6 %. Dichos resultados son similares a los obtenidos por Tafazoil *et al.* (2013) donde encontraron que en *Castanea sativa* (Mill) se logró la inducción de callo más alta (74.6%) cuando se usó medio MS en comparación con el medio B5 (69.1%).

En el Cuadro 56 se presentan los resultados obtenidos del numero de explantes con callo por unidad experimental en los dos medios de cultivo y tres tipos de explantes en la cuarta semana.

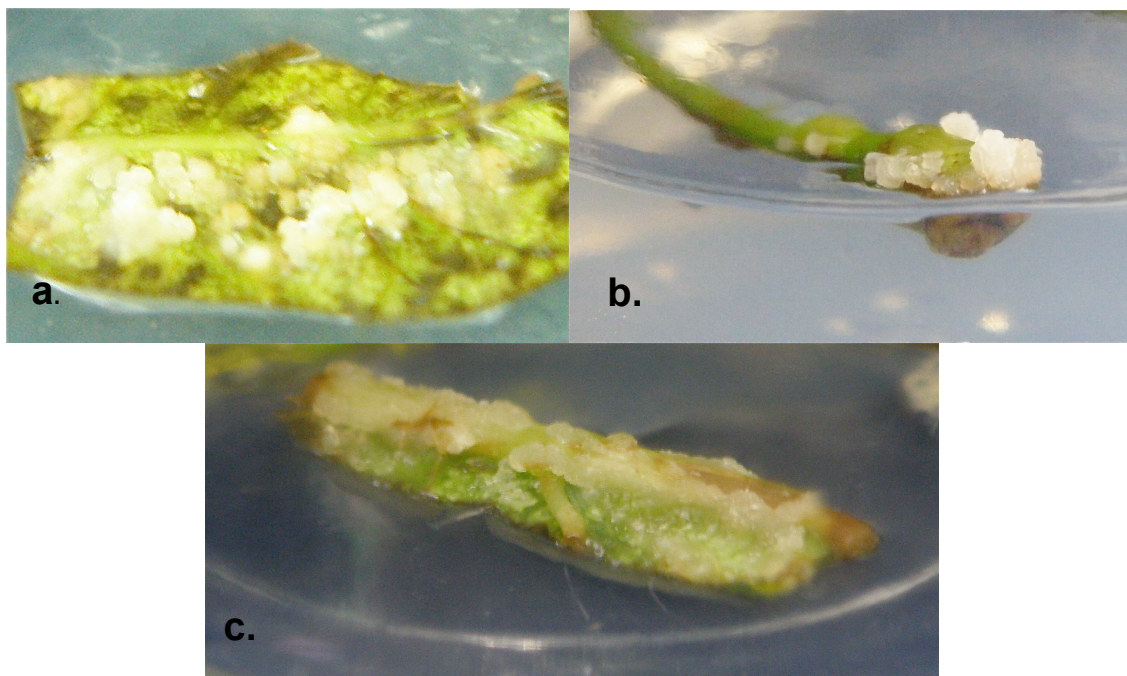


Figura 7. Explantes de nogal con presencia de callo en la cuarta semana del establecimiento a) explante tipo hoja; b) explante tipo tallo y c) explante tipo nervadura central.

Cuadro 56. Número de explantes con presencia de callo de nogal (*Carya illinoensis* [Wangenh] K. Koch) a las cuatro semanas del establecimiento, según el tipo de explante y medio de cultivo.

Medio de cultivo y explantes		Nº explantes con callo*				
		1	2	3	4	5
MS	Hoja	0	0	0	4	6
	Nervadura	0	0	1	5	4
	Tallo	0	2	6	1	1
WPM	Hoja	1	4	2	2	1
	Nervadura	1	0	2	5	2
	Tallo	0	0	6	3	1

*Por unidad experimental

El ANOVA (Cuadro 28A) para el porcentaje de formación de callo, resultó con diferencias altamente significativas para medio de cultivo y significativas para explante, además la interacción entre estos dos factores también resultó con efectos altamente significativos, por lo que se procedió a la comparación de las medias de los explantes dentro de cada medio.

Los resultados de la comparación de medias (Cuadro 57) mostraron que dentro del medio MS, los explantes de tipo hoja y nervadura fueron estadísticamente iguales, y mostraron el mayor porcentaje de formación de callo comparados con el explante tipo tallo donde se observó el menor porcentaje de formación de callo. En el medio WPM no se observaron diferencias significativas entre los explantes.

La comparación de medias (Cuadro 57) de los medios dentro de cada explante mostró diferencias significativas en cuanto al número de callos en el explante hoja encontrando el mayor porcentaje de formación de callo en el medio MS. Para el caso de los explantes de nervadura y tallo no se encontraron diferencias significativas entre los medios de cultivo.

En general el mayor número de callos se observó en el medio MS en los explantes de hoja y nervadura con porcentajes de 79.3 y 72.8% respectivamente. Tafazoil *et al.* (2013) también encontraron en *Castanea sativa* (Mill) diferencia en cuanto a la formación de callo dependiendo del tipo de explante, donde los segmentos nodales mostraron los primeros signos de formación de callo en los bordes cuando los

establecieron en el medio MS suplementado con 1.0 mg L⁻¹ de TDZ después de una semana del establecimiento, siendo éste el mejor tipo de explante.

Cuadro 57. Prueba DMS para la comparación de medias en la variable porcentajes de formación de callo para los efectos medios de cultivo y tipos de explante en el noveno experimento

medio explante	MS	WPM	Media general de explantes
Hoja	79.374 a A	50.190 a B	64.782
Nervadura	72.794 a A	62.528 a A	67.661
Tallo	53.651 b A	58.492 a A	56.071
Media general de medios	68.606	57.070	62.838

a, b: letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre tipos de explante (p<0.05)

A,B: letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre medios de cultivo con el mismo tipo de explante (p<0.05)

DMS=14.01

El mantener y cuidar las plántulas dentro del laboratorio no es garantía de poder establecer la especie, lo que mata a los explantes es la oxidación, sobre todo en plantas con tejidos jóvenes, ya que en estos el efecto de las soluciones de predesinfección y desinfección es adverso en elevadas concentraciones y tiempos prolongados.

Las técnicas utilizadas en el noveno experimento permitieron lograr el establecimiento aséptico de los explantes de hoja, nervadura y tallo donde el proceso de predesinfección y desinfección consistieron en establecer plántulas desde su

emergencia en condiciones controladas dentro del laboratorio de CTV así como asperjándolas periódicamente con una solución con 4.0 g L⁻¹ de Agry-Gent®, 2.0 g L⁻¹ de Bemil® y 200 mg L⁻¹ de ácido ascórbico; después de la colecta del material se lavó con agua y jabón para después someterlo 2 h a una solución con 2.0 g L⁻¹ de Agry-Gent®, 2.0 g L⁻¹ de Bemil®, 1.5 g L⁻¹ de Amistar®, 400 mg L⁻¹ ácido ascórbico, 150 mg L⁻¹ ácido cítrico y 30 gotas L⁻¹ de bactericida vegetal; y la desinfección fue con alcohol al 20% (v/v) e hipoclorito de sodio al 1.08% (20% v/v Cloralex®) ambas por 10 min cada una.

Las condiciones ambientales que tuvieron efecto en el cultivo *in vitro* de explantes de nogal fueron: temperatura 26 ±2°C, completa obscuridad y el medio de cultivo con las sales MS al que se le adicionó: suplementos orgánicos al myo-inositol, tiamina, ácido nicotínico, piridoxina y sacarosa, las fitohormonas AIB, BAP y picloram, además del phytigel como agente gelificante.

El medio MS fue superior al WPM, esto al producir mayor número de explantes con presencia de callo

La mejor combinación explante - medio de cultivo para mayor respuesta de los explantes a la formación de callo fue el medio MS con explantes de tipo hoja, seguido por el mismo medio pero con explantes de tipo nervadura y en tercer lugar, fue el mismo tipo de explante pero en el medio WPM.

5. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, los explantes de nogal tipo hoja, nervadura y tallo, lograron sobrevivir y formar callo *in vitro*.

Los explantes de nogal son susceptibles a contaminación por hongos y bacterias así como una rápida oxidación de los tejidos, sin embargo mediante un tratamiento específico a las plantas donantes previo a la obtención de explantes es posible obtener explantes libres de contaminación y oxidación capaces de formar callo.

La propagación *in vitro* de nogal es viable con una adecuada formación de callo, lo cual se puede lograr utilizando el medio MS con explantes de hoja y nervadura.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelwahd, R., N. Hakam, M. Labhilili and S. Udupa. 2008. Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in *in vitro* plantlet regeneration of faba bean. *African Journal of Biotechnology* 7: 997-1002.
- Acosta Solano, C. C. 2012. La micropropagación en especies forestales. *CIENCIACTUAL*, 1(2): 61-80
- Aftab, F. 2012. Progress and Prospects for Efficient Micropropagation of Woody Plants. In Ashraf, M., M. Öztürk, M. S. Aqueel and A. Aksoy (Eds.), *Crop Production for Agricultural Improvement* (pp. 363-378). London, England : Springer.
- Alcón P., J. Ligos, M. A. De Peña, A. Turrientes y O. Cisneros. 2009. Evaluación del cultivo *in vitro* de nogal (*Juglans regia* L.) para la proliferación de árboles seleccionados para la producción de madera. *Congreso Forestal Español* 5: 2-10
- Altman, A. and B. Loberant. 1998. Micropropagation: clonal plant propagation *in vitro*. En: *Agricultural Biotechnology New York* pp: 19-42
- Amin M. and V. Jaiswal. 1988. Micropropagation as an aid to rapid cloning of a guava cultivar. *Scientia Horticulturae* 36: 89-95.
- Amiot, M., F. Forget, and P. Goupy. 1996. Polyphenol, oxidation and colour: progress

- in the chemistry of enzymatic and nonenzymatic derived products. *HerbaPolonica* 42: 237-247.
- Ávila-Treviño, J. A., J. G. Arreola-Ávila, R. Trejo-Calzada, D. Valdez-Cepeda, y A. Borja-de la Rosa. 2013. Respuestas morfogénicas en la propagación in vitro de nogal pecanero (*Carya illinoensis* [Wangenh] K. Koch). *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, 19(3), 469-481.
- Azofeifa, Á. 2008. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía mesoamericana*, 153-175.
- Barrales, H. J. 2013. Producción de taxoides en cultivos *in vitro* de callos y células elicidadas de *Taxus globosa*. Tesis de doctorado. Instituto de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas. Montecillo, Texcoco, edo. De México, México.
- Baker, C. M., and H. Y. Wetzstein. 1998. Leaflet development, induction time, and medium influence somatic embryogenesis in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant cell reports*, 17(12), 925-929.
- Beena, M. R., K. P. Martin, P. B. Kirti and M. Hariharan. 2003. Rapid *in vitro* propagation of medicinally important *Ceropegia candelabrum*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 72: 285-289 .
- Beuchat, L. R. 1975. Incidence of molds on pecan nuts at different points during harvesting. *Appl Microbiol* 29: 852–854
- Bhat, S. and K. Chandel. 1991. A novel technique to overcome browning in tissue culture. *Plant Cell Reports* 10:358-361.
- Bhatia, P. and N. Ashwath. 2008. Improving the quality of *in vitro* cultured shoots of

- tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Red Coat.). *Biotechnology* 7: 188-193.
- Bonga, J. M., and D. Durzan. 1982. General principles and biotechnology. In: Bonga, J. M., and D. Durzan (Eds) *Cell and tissue culture in forestry* (416 pp) Netherlands: Springer.
- Bray, E., J. Bailey-Serres, and E. Weretilnyk. 2000. Responses to abiotic stresses. In: Biochemistry and molecular biology of plants. Buchanan, B; Gruissem, W; Jones, R. (Ed.) *American Society of Plant Physiologists*. Maryland, USA. p. 1158-1203.
- Cassells, A., and R. Curry. 2001. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 64: 145-157.
- Chipley J. R. and E. K. Heaton. 1971. Microbial flora of pecan meat. *Appl Microbiol* 22: 252-253
- Corte-Olivares, J. and G. C. Philips. 1990. Micropropagation of Pecan. *Hort.Sci.*, 25(10): 1308.
- Costa, M. L., P. M. Civello, A. R. Chaves and G. A. Martínez. 2005. Effect of ethephon and 6-benzylaminopurine on chlorophyll degrading enzymes and a peroxidase- linked chlorophyll bleaching during post-harvest senescence of broccoli (*Brassica oleracea* L.) at 20 °C. *Postharvest Biology and Technology* 35: 191-199.
- Das, T and G. Mitra. 1990. Micropropagation of *Eucalyptus tereticornis* Smith. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 22: 95-103
- Davies, M. 1972. Polyphenol synthesis in cell suspension cultures of Paul's Scarlet

- Rose. *Planta* 104: 50-65.
- Echenique, V. 2004. Asepsia en el cultivo de tejidos vegetales. En: Echenique, V., Rubinstein, C., y Mroginski, L. (Eds.). 2004. *Biotecnología y mejoramiento vegetal* II (pp. 19-21). Argentina: INTA
- Ebert A., F. Taylor and J. Blake. 1993. Changes of 6- benzylaminopurine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrations in plant tissue culture media in presence of activated charcoal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33: 157-162.
- Figueiredo, S. F. L., N. Albarello and V. R. C. Viana. 2001. Micropropagation of *Rollinia mucosa* (JACQ.) BAILL. *In vitro Cellular and Development Biology Plant* 37: 471-475.
- Finch, R., A. Baset, I. Slamet and E. Cocking. 1992. *In vitro* shoot culture of wild *Oryza* and other grass species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30: 31-39.
- Fraignier, M., L. Marques, A. Fleuriet and J. Macheix. 1995. Biochemical and immunochemical characteristics of polyphenol oxidases from different fruits of *Prunus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 2375- 2380.
- Gannoun, S, S. Lionakis, D. Gerasopoulos, N. Kaska, A. Kuden, L. Ferguson and T. Michailides. 1995. Aspects of *in vitro* culture of *Pistacia terebinthus* and *P. vera*. *Acta Horticulturae* 419: 201-206.
- George, E. 1993. Plant propagation by tissue culture; part 1. The technology. 2 ed. Exegetics Limited. England. 574 p.
- George, E. 1996. Plant propagation by tissue culture; part 2. Exegetics Limited England. 1361p.

- George, E. F. and Sherrington, P. D. 1984. Plant propagation by tissue culture. Eversley, G. B. Exegetics. pp 709.
- Guerra, M. and W. Handro. 1988. Somatic embryogenesis and plant regeneration in embryo cultures of *Euterpe edulis* Mart. (Palmae). *Plant Cell Reports* 7: 550-552.
- Gupta, P. K., A. F. Mascarenhas, and V. Jagannathan. 1981. Tissue culture of forest trees "Clonal propagation of mature trees of *Eucalyptus citriodora* Hook, by tissue culture" . *Plant Science Letters*, 20(3), 195-201.
- Hanlin R. T. 1971. Fungi isolated from young pecans. *Pecan Grow Assn* 2: 20–26
- Hansen, K. C., and J. E. Lazarte. 1984. In vitro propagation of pecan seedlings (*Carya illinoensis*). *HortScience*, 19:237-239
- Hörtensteiner, S. 1999. Chlorophyll breakdown in higher plants and algae. *Cellular and Molecular Life Sciences* 56: 330–347.
- Huang, L. C., Y. L. Lee, B. L. Huang, C. I. Kuo, and J. F. Shaw. 2002. High polyphenol oxidase activity and low titratable activity in browning bamboo tissue culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology –Plant* 38: 358–365.
- Hughes, K. W. 1981. Ornamental species. In *cloning agricultural plants via in vitro techniques*. B.V. Conger. Boca Raton, Fla. (Ed), CRC Press pp. 20-21.
- Ichihashi, S. and S. Kako. 1977. Studies in clonal propagation of *Cattleya* by tissue culture. II. Browning of *Cattleya*. *Journal Japanese Society for Horticultural Science* 46: 325-330.
- Kester, D. E. 1982. The clone in horticulture. *HortScience* 18(6): 831-837.
- Knox, C. A. and R. H. Smith. 1981. Progress in tissue culture methods for production of Riverside stocks. *Pecan Quartlery* 15, 27-34.

- Laukkanen, H., L. Rautiainen, E. Taulavuori, and A. Hohtola. 2000. Changes of cellular structures and enzymatic activities during browning of Scots pine callus derived from mature buds. *Tree Physiology* 20: 467–475.
- León, S., L. Arenas, y Z. Vilorio. 1997. Efecto de la exposición solar de las plantas donantes en la iniciación del cultivo *in vitro* de guayabo (*Psidium guajava* L) LUZ. *Rev. Fac. Agron. Venezuela* 14: 47-53.
- Levitt, J. 1980. Responses of plants to environmental stress. *Academic Press* Pp. 365-453.
- Lidemann, E., J. Gunckel and O. Davidson. 1970. Meristem culture of *Cattleya*. *American Orchid Society Bulletin* 39: 1002-1004.
- Locy, R. D. 1984. Notes on principles and applications; state of the art. *ATAS Bullentin* 1:8-13.
- Lux-Endrich, A, D. Treutter and W. Feucht. 2000. Influence of nutrients and carbohydrate supply on the phenol composition of apple shoot cultures. *Plant Cell, tissue and Organ Culture* 60: 15-21.
- Marks, T and E. Simpson. 1990. Reduced phenolic oxidation at culture initiation *in vitro* following the exposure of field- grown stock plants to darkness or low levels of irradiance. *Journal of Horticultural Science* 65: 103-111.
- Mathur, J. 1993. Somatic embryogenesis from callus culture of *Nardostachys jatamansi*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33: 163-169.
- McCown, B. H. and G. Lloyd. 1981. Woody plant medium (WPM) A mineral formulation for microculture of woody plant species. *Journal of Horticultural Science* 16, pág. 453.

- Mroginski, L., P. Sansberro y E. Flaschland. 2010. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. En G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp, y L. Mroginski (Eds.), *Biotecnología y Mejoramiento vegetal II*. (pp. 17-25) Argentina: INTA
- Mroginski, L., y W. Roca. 1991. Establecimiento de cultivos de Tejidos vegetales *in vitro*. En: Roca W. M. Y L. A. Mroginsky (eds.) Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Editorial CIAT, Cali, Colombia pp. 19-40.
- Murashige, T. And F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15 (3) : 473-479.
- Murkute, A., M. Shanti-Patil. 2003. Exudation and browning in tissue culture of pomegranate. *Agricultural Science Digest* 23: 29-31.
- Navarro L. 1988. Application of shoot tip grafting *in vitro* to woody species. *Acta Horticulturae* 227: 43-55.
- Novoa, A., M. Motidome, J. Mancini-Filho, A. Linares, M. Tanae, L. Torres, y A. Lapa. 2001. Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Bryothamnion triquetrum* (S.G. Gmelin) Howe. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 37: 373-382.
- Obeidy A. A. and M. A. L. Smith. 1993. Organogenesis from mature pecan cotyledons and embryonic axes. *Hort.Sci.*, 28(3): 213-215.
- Olivares, S. E. 2013. Paquete Estadístico de Diseños Experimentales versión 1.3 FAUANL. Escobedo N. L. s. p.
- Orona Castillo, I., D. M. Sangerman-Jarquín, M. Fortis Hernández, C. Vázquez Vázquez, and M. Á. Gallegos Robles. 2013. Producción y comercialización de

- nuez pecanera (*Carya illinoensis* Koch) en el norte de Coahuila, México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 4(3), 461-476.
- Petersen, K, J. Hansen and P. Krogstrup. 1999. Significance of different carbon sources and sterilization methods on callus induction and plant regeneration of *Miscanthus x ogiformis* Honda "Giganteus". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 58: 189-197.
- Pirela, E. 2002. Propagación clonal *in vitro* del guayabo (*Psidium guajava* L.) a partir de ápices caulinares, segmentos nodales y miniestacas de tallo. [En línea] Disponible: <http://pegasus.ucla.edu/~ve/cce/resumen/agronomia/ca2-04-ag.htm>. 2p. [noviembre 2013]
- Renukdas N. N., M. Manoharan and J. O. Jr. Garner. 2010. *In vitro* propagation of pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch]. *Plant Biotech*, 27, 211-215.
- Ripley, K. and J. Preece. 1986. Micropropagation of *Euphorbia lathyrio* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 5: 213-218.
- Rodríguez, R., S. Castañón y M. Uribe. 2005. Biotecnología forestal: presente y futuro, En Sánchez-Olate M. y Ríos-Leal D. (Ed.) Biotecnología Vegetal en especies leñosas de interés forestal (pp 5-16) Concepción, Chile: Imprenta Austral
- Rodríguez, R., M. Albuérne y B. Fernández. 2005b. Morfogénesis y su manipulación en especies leñosas. En Sánchez-Olate M. y Ríos-Leal D. (Ed.) Biotecnología Vegetal en especies leñosas de interés forestal (pp 49-62) Concepción, Chile: Imprenta Austral
- Schroeder H. W. and J. R. Cole. 1977. Natural occurrence of Alternariols in discolored pecans. *J Agric Food Chem* 25: 204–206

- Seneviratne, P. and G. Wijesekara. 1996. The problem of phenolic exudates in *in vitro* culture of mature *Hevea brasiliensis*. *Journal of Plantation Crop* 24: 54-62.
- Shao H. B., L. Y. Chu, M. A. Shao, A. Cheruth and H. M. MI. 2008. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *C.R. Biologies* 331: 433-441.
- SNIDRUS-OEIDRUS. 2013. Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable de Sonora. Sistema de información agroalimentaria. En línea [Disponible] <http://www.oeidrus-sonora.gob.mx/>
- Steward, F. C., L. M. Blakely, A. E. Kent, and M. O. Mapes. 1964. Growth and organization in free cell cultures. In *Brookhaven symposia in biology* Vol. 16, p. 73.
- Sudripta, D., B. Timir and J. Sumita. 1996. *In vitro* propagation of cashewnut. *Plant Cell Reports* 15: 615-619.
- Tabiyeh, D., F. Bernard and H. Shacker. 2006. Investigation of glutathione, salicylic acid and GA₃ effects on browning in *pistacia vera* shoot tips culture. *Acta Horticulturae* 726: 201-204.
- Tafazoli, M., S. M. H. Nasr, H. Jalilvand, and D. Bayat. 2013. Plant regeneration through indirect organogenesis of chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *African Journal of Biotechnology*, 12(51), 7063-7069.
- Tang, W., L. Harris, V. Outhavong and R. Newton. 2004. Antioxidants enhance *in vitro* plant regeneration by inhibiting the accumulation of peroxidase in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant Cell Reports* 22: 871-877.
- Tulecke, W., G. Mcgranahan and H. Ahmadi. 1988. Regeneration by somatic

- embryogenesis of triploid plants from endosperm of walnut, *Juglans regia* L. cv. Manregian. *Plant Cell Reports* 7: 301-304.
- Turrens, J. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology* 552: 335-344.
- Van Staden, J., C. Fennell and N. Taylor. 2006. Plant stress *in vitro*: the role of phytohormones. *Acta Horticulturae* 725: 55-62.
- Villalobos, A. V. y M. Thorpe. 1985. La micropropagación: conceptos, metodología y resultados. *Fundamentos y Aplicaciones del cultivo de tejidos en la agricultura*. W. Roca CIAT. Bogotá, Colombia, 67-85.
- Weinstein, L., W. Robbins and H. Perkins. 1951. Chelating agents and plant nutrition. *Science* 120: 41-43.
- Wetzstein H. Y., J. R. Ault and S. A. Merkle. 1990. Factors influencing somatic embryogenesis and plantlet regeneration in pecan, *Carya illinoensis*. *Acta Hortic.*, 280 69-73.
- Wood, B. W. 1982. *In vitro* proliferation of pecan shoots. *HortScience* 17. 890-891
- Yadav, U., M. Lal and V. Jaiswal. 1990. *In vitro* micropropagation of the tropical fruit tree *Syzygium cuminii* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 21: 87-92.
- Zaerr, J. B. and M. O. Mapes. 1982. Action of growth regulators. In *Tissue culture in forestry*. Ed. By J. M. Bonga, D. J. Durzan. La Haya, Martinus Nijhoff/Dr W. Junk pp 231-244.
- Zavaleta-Mancera, H., H. López-Delgado, H. Loza-Tavera, M. Mora-Herrera, C. Trevilla-García, M. Vargas-Suárez and H. Ougham. 2007. Cytokinin promotes catalase and ascorbate peroxidase activities and preserves the chloroplast integrity during dark-senescence. *Journal of Plant Physiology* 164: 1572-1582.

7. APENDICE

Cultivo *in vitro* de hojas y yemas de *Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch

Selección del material vegetal a partir de árboles juveniles



predesinfección en campo



predesinfección



desinfección en campana



permanencia en antioxidante



obtención de explantes tipo yemas y hojas



siembra en medio aséptico



incubación en oscuridad



evaluación

Figura 1A. Metodología a seguirse para el cultivo *in vitro* de hojas y yemas a partir de árboles juveniles de nogal (*Carya illinoensis* [Wangenh] K. Koch).

Cultivo *in vitro* de raíz, tallo y nervadura central de *Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch

Selección del material vegetal a partir de plántulas de 1 mes



predesinfección



desinfección en campana



permanencia en antioxidante



obtención de explantes tipo tallo, raíz y nervadura central



siembra en medio aséptico



incubación en oscuridad



evaluación

Figura 2A. Metodología a seguirse para el cultivo *in vitro* de raíz, tallo y nervadura central a partir de plántulas de 1 mes de nogal (*Carya illinoensis* [Wangenh] K. Koch).

Cultivo *in vitro* de tallo de *Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch

siembra de semillas en cajas magenta con peat moss estéril



extracción de las plántulas germinadas



predesinfección



desinfección en campana



permanencia en antioxidante



obtención de explantes tipo tallo



siembra en medio aséptico



incubación en oscuridad



evaluación

Figura 3A . Metodología a seguirse para el cultivo *in vitro* de tallo de nogal (*Carya illinoensis* [Wangenh] K. Koch). a partir de plántulas recién emergidas en cajas magenta.

Cultivo *in vitro* de hoja, tallo y nervadura central de *Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch

siembra de semillas en bolsas plásticas y permanencia en condiciones controladas



aspersiones periódicas a las plántulas



selección del material vegetal



predesinfección



desinfección en campana



permanencia en antioxidante



obtención de explantes tipo hoja, tallo y nervadura central



siembra en medio aséptico



incubación en oscuridad



evaluación



formación de callo

Figura 4A. Metodología a seguirse para el cultivo *in vitro* de hoja, tallo y nervadura central de nogal (*Carya illinoensis* [Wangenh] K. Koch).a partir de plántulas recién emergidas en bolsas plásticas conservadas en condiciones controladas.

Cuadro 1A. Componentes del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (1962)

Componentes	Cantidad (mg L ⁻¹)
MACROELEMENTOS	
NH ₄ NO ₃	1650.000
KNO ₃	1900.000
CaCl ₂ ·2H ₂ O	400.000
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	370.000
KH ₂ PO ₄	170.000
MICROELEMENTOS	
Na ₂ EDTA	37.300
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.800
H ₃ BO ₃	6.200
MnSO ₄ ·4 H ₂ O	22.300
ZnSO ₄ ·4 H ₂ O	8.600
KI	0.830
Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	0.250
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	0.0250
CoCl ₂ ·6 H ₂ O	0.0250
ORGÁNICOS	
Myo-Inositol	100.000
Tiamina	0.400
Acido Nicotínico	0.500
Piridoxina	0.500
Sacarosa	30000.000

Cuadro 2A.Componentes del medio de cultivo Woody Plant Medium (WPM) (1981).

Componentes	Cantidad (mg L ⁻¹)
MACROELEMENTOS	
NH ₄ NO ₃	400.000
CaCl ₂ ·2H ₂ O	96.000
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	370.000
KH ₂ PO ₄	170.000
Ca(NO ₃) ₂ · H ₂ O	556.000
K ₂ SO ₄	990.000
MICROELEMENTOS	
Na ₂ EDTA	37.300
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.800
H ₃ BO ₃	6.200
MnSO ₄ ·4 H ₂ O	22.300
ZnSO ₄ ·4 H ₂ O	8.600
Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	0.025
CuSO ₄ ·5 H ₂ O	0.025
ORGÁNICOS	
Inositol	100.000
Tiamina	1.000
Acido Nicotínico	0.500
Piridoxina	0.500
Sacarosa	30000.000

Cuadro 3A. Experimento 1. Análisis de varianza para el porcentaje de oxidación en función de los efectos de semana, tratamientos con cloro y antioxidantes y sus interacciones en explantes de hoja.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Cloro	13439.000	5	2687.800	13.220	.000 **
Antioxid	16.000	1	16.000	.079	.779
Sem	82137.500	4	20534.375	101.001	.000 **
Cloro * Antioxid	3779.000	5	755.800	3.718	.003 **
Cloro * Sem	8813.500	20	440.675	2.168	.003 **
Antioxid * Sem	211.500	4	52.875	.260	.903
Cloro * Antioxid * Sem	2263.500	20	113.175	.557	.940
Error	79290.000	390	203.308		
Total Corregido	201928.000	449			

Cuadro 4A. Experimento 1. Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación con bacteria en función de los efectos de semana, tratamientos con cloro y antioxidantes y sus interacciones en explantes de hoja.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Sem	293.482	4	73.370	.696	.595
Cloro	1093.597	5	218.719	2.074	.068
Antioxid	502.665	1	502.665	4.766	.030
Sem * Cloro	708.927	20	35.446	.336	.997
Sem * Antioxid	293.482	4	73.370	.696	.595
Cloro * Antioxid	1093.597	5	218.719	2.074	.068
Sem * Cloro * Antioxid	708.927	20	35.446	.336	.997
Error	41136.205	390	105.477		
Total Corregido	47926.884	449			

Cuadro 5A. Experimento 1. Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación con hongos en función de los efectos de semana, tratamientos con cloro y antioxidantes y sus interacciones en explantes de hoja.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.	
Sem	25170.415	4	6292.604	9.993	.000	**
Cloro	18231.845	5	3646.369	5.791	.000	**
Antioxid	6035.748	1	6035.748	9.585	.002	**
Sem * Cloro	13611.967	20	680.598	1.081	.367	
Sem * Antioxid	971.843	4	242.961	.386	.819	
Cloro * Antioxid	13163.144	5	2632.629	4.181	.001	
Sem * Cloro * Antioxid	4907.656	20	245.383	.390	.993	
Error	245583.788	390	629.702			
Total Corregido	321452.142	449				

Cuadro 6A. Experimento 2. Análisis de varianza para el porcentaje de oxidación en función de los efectos de semana, tratamientos con cloro y antioxidantes y sus interacciones en explantes de yema.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.	
SEMANA	72947.603	3	24315.868	477.020	.000	**
COLORO	198.294	3	66.098	1.297	.281	
ANTIOXIDA	6833.641	1	6833.641	134.060	.000	**
SEMANA * COLORO	468.912	9	52.101	1.022	.429	
SEMANA * ANTIOXIDA	7187.109	2	3593.555	70.497	.000	**
COLORO * ANTIOXIDA	541.533	3	180.511	3.541	.018	
SEMANA * COLORO * ANTIOXIDA	391.342	6	65.224	1.280	.276	
Error	4281.859	84	50.975			
Total Corregido	86376.229	111				

Cuadro 7A. Experimento 2. Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación bacteriana en función de los efectos de semana, tratamientos con cloro y antioxidantes y sus interacciones en explantes de yema.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
SEMANA	35288.882	3	11762.961	32.141	.000 **
COLORO	455.905	3	151.968	.415	.742
ANTIOXIDA	1075.158	1	1075.158	2.938	.090
SEMANA * COLORO	850.915	9	94.546	.258	.984
SEMANA * ANTIOXIDA	3981.301	2	1990.651	5.439	.006
COLORO * ANTIOXIDA	998.356	3	332.785	.909	.440
SEMANA * COLORO * ANTIOXIDA	1613.925	6	268.988	.735	.623
Error	30741.996	84	365.976		
Corrected Total	74097.980	111			

Cuadro 8A. Experimento 2. Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación fúngica en función de los efectos de semana, tratamientos con cloro y antioxidantes y sus interacciones en explantes de yema.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
SEMANA	989.063	3	329.688	1.765	.160
COLORO	1636.294	3	545.431	2.919	.039 *
ANTIOXIDA	283.594	1	283.594	1.518	.221
SEMANA * COLORO	1429.687	9	158.854	.850	.573
SEMANA * ANTIOXIDA	314.062	2	157.031	.841	.435
COLORO * ANTIOXIDA	175.781	3	58.594	.314	.815
SEMANA * COLORO * ANTIOXIDA	154.687	6	25.781	.138	.991
Error	15693.750	84	186.830		
Total Corregido	20039.063	111			

Cuadro 9A. Experimento 3. Análisis de varianza para el porcentaje de oxidación en función de los efectos de semana, tratamientos con cloro y antioxidantes y sus interacciones en explantes de hoja y yema.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
SEMANA	29535.406	5	5907.081	22.575	.000 **
COLORO	729.010	3	243.003	.929	.427
ANTIOXIDA	4937.215	1	4937.215	18.868	.000 **
EXPLANTE	2579.173	1	2579.173	9.857	.002 **
SEMANA * CL	946.422	14	67.602	.258	.997
SEMANA * ANTIOXIDA	935.104	5	187.021	.715	.613
SEMANA * EXPLANTE	5263.843	5	1052.769	4.023	.002 **
CL * ANTIOXIDA	1027.161	3	342.387	1.308	.272
CL * EXPLANTE	1796.050	3	598.683	2.288	.079
ANTIOXIDA * EXPLANTE	308.700	1	308.700	1.180	.278
SEMANA * CL * ANTIOXIDA	692.715	8	86.589	.331	.954
SEMANA * CL * EXPLANTE	1464.784	10	146.478	.560	.846
SEMANA * ANTIOXIDA * EXPLANTE	128.581	2	64.290	.246	.782
CL * ANTIOXIDA * EXPLANTE	2311.573	3	770.524	2.945	.033
SEMANA * CL * ANTIOXIDA * EXPLANTE	552.966	5	110.593	.423	.833
Error	73006.008	279	261.670		
Total corregido	171964.699	351			

Cuadro 10A. Experimento 3. Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación bacteriana en función de los efectos de semana, tratamientos con cloro y antioxidantes y sus interacciones en explantes de hoja y yema.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
SEMANA	7241.809	1	7241.809	16.365	.000 **
EXPLANTE	4033.061	1	4033.061	9.114	.003 **
CL	2169.111	3	723.037	1.634	.182
ANTIOXIDA	627.619	1	627.619	1.418	.235
SEMANA * EXPLANTE	.005	1	.005	.000	.997
SEMANA * CL	268.343	3	89.448	.202	.895
SEMANA * ANTIOXIDA	99.019	1	99.019	.224	.637
EXPLANTE * CL	6573.670	3	2191.223	4.952	.002 **
EXPLANTE * ANTIOXIDA	2161.233	1	2161.233	4.884	.028 *
CL * ANTIOXIDA	3980.866	3	1326.955	2.999	.032 *
SEMANA * EXPLANTE * CL	126.071	3	42.024	.095	.963
SEMANA * EXPLANTE * ANTIOXIDA	142.461	1	142.461	.322	.571
SEMANA * CL * ANTIOXIDA	780.321	3	260.107	.588	.624
EXPLANTE * CL * ANTIOXIDA	5807.564	3	1935.855	4.375	.005 *
SEMANA * EXPLANTE * CL * ANTIOXIDA	1805.980	3	601.993	1.360	.256
Error	99123.569	224	442.516		
Total Corregido	134940.703	255			

Cuadro 11A. Experimento 3. Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación fúngica en función de los efectos de semana, tratamientos con cloro y antioxidantes y sus interacciones en explantes de hoja y yema.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
SEMANA	6913.018	1	6913.018	12.140	.001 **
EXPLANTE	260.585	1	260.585	.458	.499
CL	156.182	3	52.061	.091	.965
ANTIOXIDA	6215.245	1	6215.245	10.915	.001 **
SEMANA * EXPLANTE	286.658	1	286.658	.503	.479
SEMANA * CL	217.423	3	72.474	.127	.944
SEMANA * ANTIOXIDA	886.819	1	886.819	1.557	.213
EXPLANTE * CL	947.846	3	315.949	.555	.645
EXPLANTE * ANTIOXIDA	612.320	1	612.320	1.075	.301
CL * ANTIOXIDA	230.347	3	76.782	.135	.939
SEMANA * EXPLANTE * CL	292.478	3	97.493	.171	.916
SEMANA * EXPLANTE * ANTIOXIDA	38.738	1	38.738	.068	.794
SEMANA * CL * ANTIOXIDA	417.789	3	139.263	.245	.865
EXPLANTE * CL * ANTIOXIDA	3482.886	3	1160.962	2.039	.109
SEMANA * EXPLANTE * CL * ANTIOXIDA	742.532	3	247.511	.435	.728
Error	127554.284	224	569.439		
Total Corregido	149255.148	255			

Cuadro 12A. Experimento 4. Análisis de varianza para el porcentaje de oxidación en función de los efectos de semana, explante, pretratamientos, tiempo en pretratamiento, alcohol y cloro y sus interacciones.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.	
SEMANA	64237.260	1	64237.260	332.527	.000	**
EXPLANTE	12605.040	1	12605.040	65.251	.000	**
PRETRATA	796.688	3	265.563	1.375	.253	
TIEMPOPRET	61.948	1	61.948	.321	.572	
ALCOHOL	345.182	1	345.182	1.787	.184	
COLORO	90.931	1	90.931	.471	.494	
SEMANA * EXPLANTE	20111.532	1	20111.532	104.108	.000	**
SEMANA * PRETRATA	410.795	3	136.932	.709	.548	
SEMANA * TIEMPOPRET	2.953	1	2.953	.015	.902	
SEMANA * ALCOHOL	224.060	1	224.060	1.160	.284	
SEMANA * COLORO	383.470	1	383.470	1.985	.161	
EXPLANTE * PRETRATA	5850.079	3	1950.026	10.094	.000	**
EXPLANTE * TIEMPOPRET	2432.495	1	2432.495	12.592	.001	**
EXPLANTE * ALCOHOL	702.598	1	702.598	3.637	.059	
EXPLANTE * COLORO	2960.077	1	2960.077	15.323	.000	**
PRETRATA * TIEMPOPRET	3435.769	3	1145.256	5.928	.001	**
PRETRATA * ALCOHOL	3558.649	3	1186.216	6.140	.001	**
PRETRATA * COLORO	1807.666	3	602.555	3.119	.028	*
TIEMPOPRET * ALCOHOL	3224.432	1	3224.432	16.691	.000	**
TIEMPOPRET * COLORO	3596.453	1	3596.453	18.617	.000	**
ALCOHOL * COLORO	2254.163	1	2254.163	11.669	.001	**
SEMANA * EXPLANTE * PRETRATA	669.630	3	223.210	1.155	.329	
SEMANA * EXPLANTE * TIEMPOPRET	1140.792	1	1140.792	5.905	.016	*
SEMANA * EXPLANTE * ALCOHOL	6.665	1	6.665	.035	.853	
SEMANA * EXPLANTE * COLORO	.021	1	.021	.000	.992	

Continúa: Cuadro 12A

SEMANA * PRETRATA *	328.491	3	109.497	.567	.638	
TIEMPOPRET						
SEMANA * PRETRATA *	2070.195	3	690.065	3.572	.016	*
ALCOHOL						
SEMANA * PRETRATA *	848.855	3	282.952	1.465	.227	
CLORO						
SEMANA * TIEMPOPRET *	1009.972	1	1009.972	5.228	.024	*
ALCOHOL						
SEMANA * TIEMPOPRET *	916.371	1	916.371	4.744	.031	*
CLORO						
SEMANA * ALCOHOL *	115.985	1	115.985	.600	.440	
CLORO						
EXPLANTE * PRETRATA *	4333.248	3	1444.416	7.477	.000	**
TIEMPOPRET						
EXPLANTE * PRETRATA *	418.332	3	139.444	.722	.541	
ALCOHOL						
EXPLANTE * PRETRATA *	2581.243	3	860.414	4.454	.005	*
CLORO						
EXPLANTE * TIEMPOPRET *	277.501	1	277.501	1.436	.233	
ALCOHOL						
EXPLANTE * TIEMPOPRET *	4316.738	1	4316.738	22.346	.000	**
CLORO						
EXPLANTE * ALCOHOL *	26.079	1	26.079	.135	.714	
CLORO						
PRETRATA * TIEMPOPRET *	2981.026	3	993.675	5.144	.002	*
ALCOHOL						
PRETRATA * TIEMPOPRET *	8156.628	3	2718.876	14.074	.000	**
CLORO						
PRETRATA * ALCOHOL *	7284.646	3	2428.215	12.570	.000	**
CLORO						
TIEMPOPRET * ALCOHOL *	239.992	1	239.992	1.242	.267	
CLORO						
SEMANA * EXPLANTE *	177.276	3	59.092	.306	.821	
PRETRATA * TIEMPOPRET						
SEMANA * EXPLANTE *	734.920	3	244.973	1.268	.288	
PRETRATA * ALCOHOL						

Continúa: Cuadro 12A

SEMANA * EXPLANTE *	825.281	3	275.094	1.424	.239	
PRETRATA * CLORO						
SEMANA * EXPLANTE *	8.621	1	8.621	.045	.833	
TIEMPOPRET * ALCOHOL						
SEMANA * EXPLANTE *	63.083	1	63.083	.327	.569	
TIEMPOPRET * CLORO						
SEMANA * EXPLANTE *	114.983	1	114.983	.595	.442	
ALCOHOL * CLORO						
SEMANA * PRETRATA *	1648.437	3	549.479	2.844	.040	*
TIEMPOPRET * ALCOHOL						
SEMANA * PRETRATA *	1007.842	3	335.947	1.739	.162	
TIEMPOPRET * CLORO						
SEMANA * PRETRATA *	813.983	3	271.328	1.405	.245	
ALCOHOL * CLORO						
SEMANA * TIEMPOPRET *	70.304	1	70.304	.364	.547	
ALCOHOL * CLORO						
EXPLANTE * PRETRATA *	1812.160	3	604.053	3.127	.028	*
TIEMPOPRET * ALCOHOL						
EXPLANTE * PRETRATA *	893.516	3	297.839	1.542	.207	
TIEMPOPRET * CLORO						
EXPLANTE * PRETRATA *	347.208	3	115.736	.599	.617	
ALCOHOL * CLORO						
EXPLANTE * TIEMPOPRET *	2636.701	1	2636.701	13.649	.000	**
ALCOHOL * CLORO						
PRETRATA * TIEMPOPRET *	1560.678	3	520.226	2.693	.049	
ALCOHOL * CLORO						
SEMANA * EXPLANTE *	1622.867	3	540.956	2.800	.043	
PRETRATA * TIEMPOPRET *						
ALCOHOL						
SEMANA * EXPLANTE *	1091.630	3	363.877	1.884	.136	
PRETRATA * TIEMPOPRET *						
CLORO						
SEMANA * EXPLANTE *	1154.739	3	384.913	1.993	.118	
PRETRATA * ALCOHOL *						
CLORO						

Continúa: Cuadro 12A

SEMANA * EXPLANTE *	682.851	1	682.851	3.535	.062
TIEMPOPRET * ALCOHOL *					
COLORO					
SEMANA * PRETRATA *	199.259	3	66.420	.344	.794
TIEMPOPRET * ALCOHOL *					
COLORO					
EXPLANTE * PRETRATA *	945.482	3	315.161	1.631	.185
TIEMPOPRET * ALCOHOL *					
COLORO					
SEMANA * EXPLANTE *	316.197	3	105.399	.546	.652
PRETRATA * TIEMPOPRET *					
ALCOHOL * COLORO					
Error	24726.935	128	193.179		
Error corregido	210269.604	255			

Cuadro 13A. Experimento 4. Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación bacteriana en función de los efectos de semana, explante, pretratamiento, tiempo en pretratamiento, alcohol y tratamientos con cloro y sus interacciones.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
SEMANA	2473.460	1	2473.460	3.124	.080
EXPLANTE	14960.696	1	14960.696	18.896	.000 **
PRETRATA	10479.920	3	3493.307	4.412	.005 **
TIEMPOPRET	29863.881	1	29863.881	37.720	.000 **
ALCOHOL	4279.564	1	4279.564	5.405	.022 *
COLORO	1180.261	1	1180.261	1.491	.224
SEMANA * EXPLANTE	.025	1	.025	.000	.996
SEMANA * PRETRATA	2160.086	3	720.029	.909	.439
SEMANA * TIEMPOPRET	1174.367	1	1174.367	1.483	.225
SEMANA * ALCOHOL	.037	1	.037	.000	.995
SEMANA * COLORO	33.167	1	33.167	.042	.838
EXPLANTE * PRETRATA	7438.027	3	2479.342	3.132	.028 *
EXPLANTE * TIEMPOPRET	1153.238	1	1153.238	1.457	.230
EXPLANTE * ALCOHOL	5659.512	1	5659.512	7.148	.008 *
EXPLANTE * COLORO	2447.240	1	2447.240	3.091	.081
PRETRATA * TIEMPOPRET	3315.743	3	1105.248	1.396	.247
PRETRATA * ALCOHOL	2998.914	3	999.638	1.263	.290
PRETRATA * COLORO	5117.343	3	1705.781	2.155	.097
TIEMPOPRET * ALCOHOL	2659.405	1	2659.405	3.359	.069
TIEMPOPRET * COLORO	31.962	1	31.962	.040	.841
ALCOHOL * COLORO	17941.167	1	17941.167	22.661	.000 **
SEMANA * EXPLANTE * PRETRATA	1965.027	3	655.009	.827	.481
SEMANA * EXPLANTE * TIEMPOPRET	189.694	1	189.694	.240	.625
SEMANA * EXPLANTE * ALCOHOL	157.412	1	157.412	.199	.656
SEMANA * EXPLANTE * COLORO	199.735	1	199.735	.252	.616

Continúa: Cuadro 13A

SEMANA * PRETRATA *	697.654	3	232.551	.294	.830	
TIEMPOPRET						
SEMANA * PRETRATA *	1253.234	3	417.745	.528	.664	
ALCOHOL						
SEMANA * PRETRATA *	1240.088	3	413.363	.522	.668	
COLORO						
SEMANA * TIEMPOPRET *	105.308	1	105.308	.133	.716	
ALCOHOL						
SEMANA * TIEMPOPRET *	1714.722	1	1714.722	2.166	.144	
COLORO						
SEMANA * ALCOHOL *	401.222	1	401.222	.507	.478	
COLORO						
EXPLANTE * PRETRATA *	6162.819	3	2054.273	2.595	.055	
TIEMPOPRET						
EXPLANTE * PRETRATA *	6802.695	3	2267.565	2.864	.039	*
ALCOHOL						
EXPLANTE * PRETRATA *	3914.426	3	1304.809	1.648	.182	
COLORO						
EXPLANTE * TIEMPOPRET	734.328	1	734.328	.928	.337	
* ALCOHOL						
EXPLANTE * TIEMPOPRET	4578.921	1	4578.921	5.784	.018	*
* COLORO						
EXPLANTE * ALCOHOL *	3198.649	1	3198.649	4.040	.047	*
COLORO						
PRETRATA * TIEMPOPRET	3930.251	3	1310.084	1.655	.180	
* ALCOHOL						
PRETRATA * TIEMPOPRET	10372.897	3	3457.632	4.367	.006	*
* COLORO						
PRETRATA * ALCOHOL *	1747.735	3	582.578	.736	.532	
COLORO						
TIEMPOPRET * ALCOHOL *	1285.967	1	1285.967	1.624	.205	
COLORO						
SEMANA * EXPLANTE *	2031.750	3	677.250	.855	.466	
PRETRATA * TIEMPOPRET						

Continúa: Cuadro 13A

SEMANA * EXPLANTE *	771.309	3	257.103	.325	.807
PRETRATA * ALCOHOL					
SEMANA * EXPLANTE *	1718.118	3	572.706	.723	.540
PRETRATA * CLORO					
SEMANA * EXPLANTE *	1388.755	1	1388.755	1.754	.188
TIEMPOPRET * ALCOHOL					
SEMANA * EXPLANTE *	121.310	1	121.310	.153	.696
TIEMPOPRET * CLORO					
SEMANA * EXPLANTE *	1180.089	1	1180.089	1.491	.224
ALCOHOL * CLORO					
SEMANA * PRETRATA *	1882.975	3	627.658	.793	.500
TIEMPOPRET * ALCOHOL					
SEMANA * PRETRATA *	1554.830	3	518.277	.655	.581
TIEMPOPRET * CLORO					
SEMANA * PRETRATA *	325.285	3	108.428	.137	.938
ALCOHOL * CLORO					
SEMANA * TIEMPOPRET *	82.131	1	82.131	.104	.748
ALCOHOL * CLORO					
EXPLANTE * PRETRATA *	2033.123	3	677.708	.856	.466
TIEMPOPRET * ALCOHOL					
EXPLANTE * PRETRATA *	10445.580	3	3481.860	4.398	.006 *
TIEMPOPRET * CLORO					
EXPLANTE * PRETRATA *	6283.710	3	2094.570	2.646	.052
ALCOHOL * CLORO					
EXPLANTE * TIEMPOPRET	178.554	1	178.554	.226	.636
* ALCOHOL * CLORO					
PRETRATA * TIEMPOPRET	653.956	3	217.985	.275	.843
* ALCOHOL * CLORO					
SEMANA * EXPLANTE *	496.254	3	165.418	.209	.890
PRETRATA * TIEMPOPRET					
* ALCOHOL					
SEMANA * EXPLANTE *	702.655	3	234.218	.296	.828
PRETRATA * TIEMPOPRET					
* CLORO					

Continúa: Cuadro 13A

SEMANA * EXPLANTE *	338.556	3	112.852	.143	.934
PRETRATA * ALCOHOL *					
COLORO					
SEMANA * EXPLANTE *	129.682	1	129.682	.164	.686
TIEMPOPRET * ALCOHOL *					
COLORO					
SEMANA * PRETRATA *	1798.892	3	599.631	.757	.520
TIEMPOPRET * ALCOHOL *					
COLORO					
EXPLANTE * PRETRATA *	5828.136	3	1942.712	2.454	.066
TIEMPOPRET * ALCOHOL *					
COLORO					
SEMANA * EXPLANTE *	107.378	3	35.793	.045	.987
PRETRATA * TIEMPOPRET					
* ALCOHOL * COLORO					
Error	101340.130	128	791.720		
Error corregido	307413.954	255			

Cuadro 14A. Experimento 4. Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación fúngica en función de los efectos de semana, explante, pretratamientos, tiempo en pretratamiento, alcohol y cloro y sus interacciones.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
SEMANA	621.022	1	621.022	5.647	.019 *
EXPLANTE	924.392	1	924.392	8.405	.004 **
PRETRATA	378.675	3	126.225	1.148	.333
TIEMPOPRET	16.285	1	16.285	.148	.701
ALCOHOL	1607.192	1	1607.192	14.614	.000 **
COLORO	1187.822	1	1187.822	10.800	.001 **
SEMANA * EXPLANTE	340.940	1	340.940	3.100	.081
SEMANA * PRETRATA	207.417	3	69.139	.629	.598
SEMANA * TIEMPOPRET	.013	1	.013	.000	.991
SEMANA * ALCOHOL	621.022	1	621.022	5.647	.019 *
SEMANA * COLORO	372.309	1	372.309	3.385	.068
EXPLANTE * PRETRATA	170.397	3	56.799	.516	.672
EXPLANTE * TIEMPOPRET	31.929	1	31.929	.290	.591
EXPLANTE * ALCOHOL	924.392	1	924.392	8.405	.004 **
EXPLANTE * COLORO	613.990	1	613.990	5.583	.020 *
PRETRATA * TIEMPOPRET	1234.699	3	411.566	3.742	.013 *
PRETRATA * ALCOHOL	378.675	3	126.225	1.148	.333
PRETRATA * COLORO	236.763	3	78.921	.718	.543
TIEMPOPRET * ALCOHOL	16.285	1	16.285	.148	.701
TIEMPOPRET * COLORO	2.527	1	2.527	.023	.880
ALCOHOL * COLORO	1187.822	1	1187.822	10.800	.001 **
SEMANA * EXPLANTE * PRETRATA	134.745	3	44.915	.408	.747
SEMANA * EXPLANTE * TIEMPOPRET	40.193	1	40.193	.365	.547
SEMANA * EXPLANTE * ALCOHOL	340.940	1	340.940	3.100	.081
SEMANA * EXPLANTE * COLORO	164.855	1	164.855	1.499	.223

Continúa: Cuadro 14A

SEMANA * PRETRATA *	343.416	3	114.472	1.041	.377	
TIEMPOPRET						
SEMANA * PRETRATA *	207.417	3	69.139	.629	.598	
ALCOHOL						
SEMANA * PRETRATA *	220.654	3	73.551	.669	.573	
COLORO						
SEMANA * TIEMPOPRET *	.013	1	.013	.000	.991	
ALCOHOL						
SEMANA * TIEMPOPRET *	30.350	1	30.350	.276	.600	
COLORO						
SEMANA * ALCOHOL *	372.309	1	372.309	3.385	.068	
COLORO						
EXPLANTE * PRETRATA *	503.112	3	167.704	1.525	.211	
TIEMPOPRET						
EXPLANTE * PRETRATA *	170.397	3	56.799	.516	.672	
ALCOHOL						
EXPLANTE * PRETRATA *	282.706	3	94.235	.857	.465	
COLORO						
EXPLANTE * TIEMPOPRET	31.929	1	31.929	.290	.591	
* ALCOHOL						
EXPLANTE * TIEMPOPRET	127.138	1	127.138	1.156	.284	
* COLORO						
EXPLANTE * ALCOHOL *	613.990	1	613.990	5.583	.020	*
COLORO						
PRETRATA * TIEMPOPRET	1234.699	3	411.566	3.742	.013	*
* ALCOHOL						
PRETRATA * TIEMPOPRET	687.175	3	229.058	2.083	.106	
* COLORO						
PRETRATA * ALCOHOL *	236.763	3	78.921	.718	.543	
COLORO						
TIEMPOPRET * ALCOHOL *	2.527	1	2.527	.023	.880	
COLORO						
SEMANA * EXPLANTE *	125.618	3	41.873	.381	.767	
PRETRATA * TIEMPOPRET						

Continúa: Cuadro 14A

SEMANA * EXPLANTE *	134.745	3	44.915	.408	.747
PRETRATA * ALCOHOL					
SEMANA * EXPLANTE *	293.182	3	97.727	.889	.449
PRETRATA * CLORO					
SEMANA * EXPLANTE *	40.193	1	40.193	.365	.547
TIEMPOPRET * ALCOHOL					
SEMANA * EXPLANTE *	143.156	1	143.156	1.302	.256
TIEMPOPRET * CLORO					
SEMANA * EXPLANTE *	164.855	1	164.855	1.499	.223
ALCOHOL * CLORO					
SEMANA * PRETRATA *	343.416	3	114.472	1.041	.377
TIEMPOPRET * ALCOHOL					
SEMANA * PRETRATA *	77.603	3	25.868	.235	.872
TIEMPOPRET * CLORO					
SEMANA * PRETRATA *	220.654	3	73.551	.669	.573
ALCOHOL * CLORO					
SEMANA * TIEMPOPRET *	30.350	1	30.350	.276	.600
ALCOHOL * CLORO					
EXPLANTE * PRETRATA *	503.112	3	167.704	1.525	.211
TIEMPOPRET * ALCOHOL					
EXPLANTE * PRETRATA *	209.810	3	69.937	.636	.593
TIEMPOPRET * CLORO					
EXPLANTE * PRETRATA *	282.706	3	94.235	.857	.465
ALCOHOL * CLORO					
EXPLANTE * TIEMPOPRET	127.138	1	127.138	1.156	.284
* ALCOHOL * CLORO					
PRETRATA * TIEMPOPRET	687.175	3	229.058	2.083	.106
* ALCOHOL * CLORO					
SEMANA * EXPLANTE *	125.618	3	41.873	.381	.767
PRETRATA * TIEMPOPRET					
* ALCOHOL					
SEMANA * EXPLANTE *	5.006	3	1.669	.015	.997
PRETRATA * TIEMPOPRET					
* CLORO					

Continúa: Cuadro 14A

SEMANA * EXPLANTE *	293.182	3	97.727	.889	.449
PRETRATA * ALCOHOL *					
COLORO					
SEMANA * EXPLANTE *	143.156	1	143.156	1.302	.256
TIEMPOPRET * ALCOHOL *					
COLORO					
SEMANA * PRETRATA *	77.603	3	25.868	.235	.872
TIEMPOPRET * ALCOHOL *					
COLORO					
EXPLANTE * PRETRATA *	209.810	3	69.937	.636	.593
TIEMPOPRET * ALCOHOL *					
COLORO					
SEMANA * EXPLANTE *	5.006	3	1.669	.015	.997
PRETRATA * TIEMPOPRET					
* ALCOHOL * COLORO					
Error	14077.407	128	109.980		
Error corregido	35140.395	255			

Cuadro 15A. Experimento 5. Análisis de varianza para el porcentaje de oxidación en función de los efectos de semana, explante, tratamientos con cloro y medio de cultivo y sus interacciones.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Semana	31798.025	1	31798.025	1322.131	.000 **
Explante	503.401	2	251.700	10.465	.000 **
Cloro	384.138	1	384.138	15.972	.000 **
Medio	.036	1	.036	.002	.969
Semana * Explante	1325.879	2	662.939	27.564	.000 **
Semana * Cloro	395.953	1	395.953	16.463	.000 **
Semana * Medio	13.771	1	13.771	.573	.451
Explante * Cloro	58.874	2	29.437	1.224	.299
Explante * Medio	45.734	2	22.867	.951	.390
Cloro * Medio	.416	1	.416	.017	.896
Semana * Explante * Cloro	64.160	2	32.080	1.334	.268
Semana * Explante * Medio	10.200	2	5.100	.212	.809
Semana * Cloro * Medio	25.610	1	25.610	1.065	.305
Explante * Cloro * Medio	109.953	2	54.977	2.286	.107
Semana * Explante * Cloro * Medio	34.193	2	17.096	.711	.494
Error	2308.856	96	24.051		
Corrected Total	37079.199	119			

Cuadro 16A. Experimento 5. Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación bacteriana en función de los efectos de semana, explante, tratamientos con cloro y medio de cultivo y sus interacciones.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Semana	15444.005	1	15444.005	24.157	.000 **
Explante	6774.487	2	3387.244	5.298	.007 *
Cloro	794.403	1	794.403	1.243	.268
Medio	16161.263	1	16161.263	25.279	.000 **
Semana * Explante	2380.628	2	1190.314	1.862	.161
Semana * Cloro	119.743	1	119.743	.187	.666
Semana * Medio	83.781	1	83.781	.131	.718
Explante * Cloro	216.706	2	108.353	.169	.844
Explante * Medio	4077.965	2	2038.982	3.189	.046 *
Cloro * Medio	475.495	1	475.495	.744	.391
Semana * Explante * Cloro	1261.485	2	630.743	.987	.377
Semana * Explante * Medio	904.180	2	452.090	.707	.496
Semana * Cloro * Medio	12.357	1	12.357	.019	.890
Explante * Cloro * Medio	384.420	2	192.210	.301	.741
Semana * Explante * Cloro * Medio	170.181	2	85.091	.133	.876
Error	61375.021	96	639.323		
Corrected Total	110636.122	119			

Cuadro 17A. Experimento 5. Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación fúngica en función de los efectos de semana, explante, tratamientos con cloro y medio de cultivo y sus interacciones.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Semana	7213.410	1	7213.410	66.140	.000 **
Explante	1056.163	2	528.081	4.842	.010 **
Cloro	66.365	1	66.365	.609	.437
Medio	149.885	1	149.885	1.374	.244
Semana * Explante	1056.163	2	528.081	4.842	.010 **
Semana * Cloro	66.365	1	66.365	.609	.437
Semana * Medio	149.885	1	149.885	1.374	.244
Explante * Cloro	77.087	2	38.543	.353	.703
Explante * Medio	155.684	2	77.842	.714	.492
Cloro * Medio	16.794	1	16.794	.154	.696
Semana * Explante * Cloro	77.087	2	38.543	.353	.703
Semana * Explante * Medio	155.684	2	77.842	.714	.492
Semana * Cloro * Medio	16.794	1	16.794	.154	.696
Explante * Cloro * Medio	46.656	2	23.328	.214	.808
Semana * Explante * Cloro * Medio	46.656	2	23.328	.214	.808
Error	10470.005	96	109.063		
Corrected Total	20820.681	119			

Cuadro 18A. Experimento 6. Análisis de varianza para el porcentaje de oxidación en función de los efectos de semana, explante y tratamientos con cloro y sus interacciones.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Semana	12219.768	1	12219.768	102.890	.000 **
Explante	1585.184	2	792.592	6.674	.003 **
Cloro	99.164	1	99.164	.835	.365
Semana * Explante	414.956	2	207.478	1.747	.185
Semana * Cloro	7.229	1	7.229	.061	.806
Explante * Cloro	42.959	2	21.480	.181	.835
Semana * Explante * Cloro	19.571	2	9.786	.082	.921
Error	5700.718	48	118.765		
Total	189613.481	60			
Corrected Total	20089.550	59			

Cuadro 19A. Experimento 6. Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación bacteriana en función de los efectos de semana, explante y tratamientos con cloro y sus interacciones.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Semana	3014.231	1	3014.231	7.410	.009 *
Explante	1305.882	2	652.941	1.605	.211
Cloro	1005.476	1	1005.476	2.472	.122
Semana * Explante	117.157	2	58.578	.144	.866
Semana * Cloro	1.108	1	1.108	.003	.959
Explante * Cloro	35.581	2	17.790	.044	.957
Semana * Explante * Cloro	187.060	2	93.530	.230	.795
Error	19525.985	48	406.791		
Corrected Total	25192.480	59			

Cuadro 20A. Experimento 6. Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación fúngica en función de los efectos de semana, explante y tratamientos con cloro y sus interacciones.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Semana	7731.710	1	7731.710	20.200	.000 **
Explante	626.206	2	313.103	.818	.447
Cloro	27.705	1	27.705	.072	.789
Semana * Explante	87.470	2	43.735	.114	.892
Semana * Cloro	8.477	1	8.477	.022	.882
Explante * Cloro	300.869	2	150.435	.393	.677
Semana * Explante * Cloro	377.858	2	188.929	.494	.613
Error	18372.446	48	382.759		
Corrected Total	27532.742	59			

Cuadro 21A. Experimento 7. Análisis de varianza para el porcentaje de oxidación en función de los efectos de semana, explante y tratamientos con cloro y sus interacciones.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Semana	43031.444	4	10757.861	229.926	.000 **
Explante	196.802	1	196.802	4.206	.042 *
Cloro	269.560	3	89.853	1.920	.128
Semana * Explante	210.409	4	52.602	1.124	.347
Semana * Cloro	343.162	12	28.597	.611	.831
Explante * Cloro	706.916	3	235.639	5.036	.002 **
Semana * Explante * Cloro	767.539	12	63.962	1.367	.187
Total	1200130.169	200			
Corrected Total	53011.975	199			

Cuadro 22A. Experimento 7. Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación bacteriana en función de los efectos de semana, explante y tratamientos con cloro y sus interacciones.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Semana	146.442	4	36.611	.759	.554
Explante	.818	1	.818	.017	.897
Cloro	335.187	3	111.729	2.316	.078
Semana * Explante	1.672	4	.418	.009	1.000
Semana * Cloro	149.787	12	12.482	.259	.994
Explante * Cloro	667.920	3	222.640	4.614	.004 **
Semana * Explante * Cloro	294.557	12	24.546	.509	.907
Error	7719.737	160	48.248		
Corrected Total	9316.120	199			

Cuadro 23A. Experimento 7. Análisis de varianza para la contaminación fúngica en función de los efectos de semana, explante y tratamientos con cloro y sus interacciones.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Semana	1002.868	4	250.717	.700	.593
Explante	.125	1	.125	.000	.985
Cloro	2820.100	3	940.033	2.624	.052
Semana * Explante	32.696	4	8.174	.023	.999
Semana * Cloro	380.853	12	31.738	.089	1.000
Explante * Cloro	5384.782	3	1794.927	5.011	.002 **
Semana * Explante * Cloro	524.802	12	43.734	.122	1.000
Error	57316.441	160	358.228		
Corrected Total	67462.667	199			

Cuadro 24A. Experimento 8. Análisis de varianza para el porcentaje de oxidación en función de los efectos de semana, explante y tratamientos con cloro y sus interacciones.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Semana	42794.770	4	10698.693	200.153	.000 **
Explante	1.589	1	1.589	.030	.863
Cloro	472.420	3	157.473	2.946	.035 *
Semana * Explante	456.023	4	114.006	2.133	.079
Semana * Cloro	478.209	12	39.851	.746	.705
Explante * Cloro	167.617	3	55.872	1.045	.374
Semana * Explante * Cloro	541.310	12	45.109	.844	.605
Error	8552.404	160	53.453		
Corrected Total	53464.342	199			

Cuadro 25A. Experimento 8. Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación fúngica en función de los efectos de semana, explante y tratamientos con cloro y sus interacciones.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Semana	521.650	4	130.412	.429	.788
Explante	2914.782	1	2914.782	9.581	.002 **
Cloro	2223.187	3	741.062	2.436	.067
Semana * Explante	521.650	4	130.412	.429	.788
Semana * Cloro	425.132	12	35.428	.116	1.000
Explante * Cloro	2223.187	3	741.062	2.436	.067
Semana * Explante * Cloro	425.132	12	35.428	.116	1.000
Error	48678.005	160	304.238		
Corrected Total	57932.725	199			

Cuadro 26A. Experimento 9. Análisis de varianza para el porcentaje de oxidación en función de los efectos de semana, explante y medio de cultivo y sus interacciones.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
semana	3176.160	2	1588.080	131.812	.000 **
explante	8.643	2	4.321	.359	.699
medio	58.290	1	58.290	4.838	.029 **
semana * explante	5.977	4	1.494	.124	.974
semana * medio	10.532	2	5.266	.437	.647
explante * medio	74.886	2	37.443	3.108	.047 **
semana * explante * medio	5.298	4	1.324	.110	.979
Error	2385.516	198	12.048		
Corrected Total	5725.301	215			

Cuadro 27A. Experimento 9. Análisis de varianza para el porcentaje de contaminación fúngica en función de los efectos de semana, explante y medio de cultivo y sus interacciones.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
semana	2456.149	2	1228.075	10.559	.000
explante	79.770	2	39.885	.343	.710
medio	61.785	1	61.785	.531	.467
semana * explante	50.091	4	12.523	.108	.980
semana * medio	15.518	2	7.759	.067	.935
explante * medio	140.233	2	70.116	.603	.548
semana * explante * medio	92.611	4	23.153	.199	.939
Error	23028.431	198	116.305		
Corrected Total	25924.589	215			

Cuadro 28A. Experimento 9. Análisis de varianza para la formación de callo.

FV	SC	GL	CM	F	Sig.
Explante	1456.584	2	728.292	2.987	.059*
Medio	1996.437	1	1996.437	8.188	.006**
*Explante * Medio	2906.327	2	1453.163	5.960	.005**
Error	13165.889	54	243.813		
Total corregido	19525.236	59			